

AJ

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
13. Juni 2002 (13.06.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/46719 A2

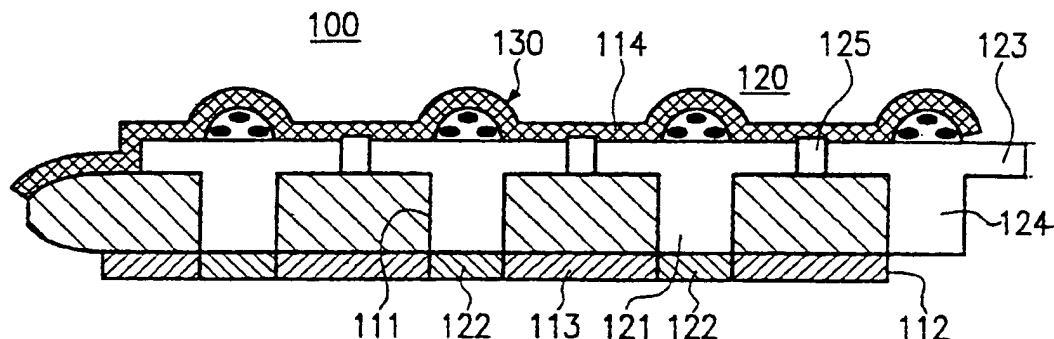
- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: G01N 1/42, B01L 7/00, A01N 1/02
- (74) Anwalt: HERTZ, Oliver; v. Bezold & Sozien, Akademiestrasse 7, 80799 München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/14400
- (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum: 7. Dezember 2001 (07.12.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
100 60 889.2 7. Dezember 2000 (07.12.2000) DE  
101 44 925.9 12. September 2001 (12.09.2001) DE
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstraße 54, 80636 München (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): FUHR, Günter [DE/DE]; Kavalierstrasse 15, 13187 Berlin (DE). HAGEDORN, Rolf [DE/DE]; Wartiner Str. 16, 13057 Berlin (DE). ZIMMERMANN, Heiko [DE/DE]; Untere Kaiserstr. 42, 66386 St. Ingbert (DE).
- Veröffentlicht:  
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



WO 02/46719 A2

(54) Title: CRYOSTORAGE METHOD AND DEVICE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR KRYOSPEICHERUNG



(57) Abstract: The invention relates to a cryopreservation method, according to which at least one sample is placed on a storage substrate, and position-specific sample data that characterizes attributes of the sample is stored. The invention also relates to a storage substrate for use in cryopreservation involving a method of the aforementioned type.

(57) Zusammenfassung: Bei einem Verfahren zur Kryokonservierung werden auf einem Speichersubstrat mindestens eine Probe angeordnet und positionsspezifisch Probandaten, die für Merkmale der Probe charakteristisch sind, gespeichert. Es wird auch ein Speichersubstrat zur Kryokonservierung mit einem derartigen Verfahren beschrieben.

## Verfahren und Vorrichtung zur Kryospeicherung

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Kryospeicherung von Proben, insbesondere zur Herstellung, Lagerung und Manipulierung biologischer Proben im kryokonservierten oder aufgetauten Zustand, wie z. B. ein Kryospeicherungsverfahren für biologische Zellen. Die Erfindung betrifft auch Verfahren zum Schreiben und Lesen von Daten. Die Erfindung betrifft weiterhin eine Vorrichtung zur Kryospeicherung von Proben, insbesondere ein Speichersubstrat für biologische Proben, wie z. B. Zellen oder Zellbestandteile, eine Vorrichtung zum Schreiben und Lesen von Daten in Speichermedien und eine Kryobanksystem. Die Erfindung betrifft auch Anwendungen der Kryokonservierung biologischer Proben.

Die Kryokonservierung ist ein allgemein bekanntes Verfahren zur Haltbarmachung insbesondere biologisch oder medizinisch relevanter Materialien. Diese Materialien umfassen bspw. Gewebe und Organe, Körperflüssigkeiten oder auch einzelne Zellen oder Zellbestandteile. Die Kryokonservierung erfolgt nach bestimmten Prozeduren in Behältern oder auf Substraten, deren Gestalt an das Material oder Probe angepasst ist. Behälter zur Kryokonservierung sind bspw. für Gewebe und Organe (siehe DE-OS 199 22 31, EP-A 0 853 238, DE-OS 197 25 768, DE-OS 199 05 163), für Blutkomponenten (siehe z. B. DE-OS 198 26 350) und für zell- oder tropfenförmige Kryoproben (siehe z. B. US-A-5 275 016, EP-B 0 475 409, DE-OS 199 21 236, EP-B 0 804 073) bekannt.

Ein generelles Anliegen bei der Kryokonservierung biologischer Proben besteht in der Identifizierbarkeit der Proben. Kryokonservierte Proben müssen in Bezug auf ihre Herkunft und Eigenschaften mit hoher Sicherheit identifizierbar sein, ohne dass ein Auftauen erforderlich ist. Bei den makroskopischen Kryo-

proben ist dies kein Problem, da Organ- oder Blutbehälter mit einer Beschriftung versehen werden können. Das Auffinden der Kryoproben erfolgt in Abhängigkeit vom Ablagesystem der jeweiligen Kryobank.

Bei kleinen Kryoproben in Form von gefrorenen Suspensionstropfen, Zellen, Zellaggregaten oder Zellbestandteilen ist die Identifizierung der Kryoproben erheblich problematischer. Eine Kryoprobe wäre gegenüber der Beschriftung vernachlässigbar klein. Oft besteht ein Interesse an der Kryokonservierung einer Vielzahl mikroskopisch kleiner Proben. Die Lagerung und Identifizierung von kleinen Kryoproben mit Beschriftung wäre unpraktikabel. Des Weiteren liegen die kryokonservierten Zellproben bei herkömmlichen Konservierungstechniken, die auf dem Aufsprühen von Zellsuspensionen auf gekühlte Oberflächen (siehe z. B. EP-B 0 475 409) beruht, in einem ungeordneten Zustand vor. Es können lediglich größere Menge von Einzelproben unspezifisch gemeinsam konserviert werden.

Bei den in EP-B 0 804 073 und DE-OS 199 21 236 beschriebenen Konservierungstechniken ist eine geordnete Ablage und spezifische Bearbeitung selbst kleinster Proben auf Kryosubstraten möglich. Die Probenablage erfolgt bspw. unter Verwendung einer Mikrotropfenschusseinrichtung, die auf der Grundlage bestimmter Zielkoordinaten angesteuert wird. Die Proben befinden sich auf definierten Substratpositionen, an denen auch eine spezifische Vermessung von Probeneigenschaften und Identifizierung der Proben ermöglicht wird. Das Substrat kann mit einer Markierung versehen sein, um die Probenpositionen auf dem Substrat zu definieren. Beispielsweise wird in DE-OS 199 21 236 für die matrixartige Ablage von Kryoproben in geraden Zeilen und Spalten vorgeschlagen, das Substrat mit einer Bezeichnung

der Spalten und Zeilen zu versehen. Diese Markierungstechnik ist in Figur 27 (Stand der Technik) illustriert.

Die herkömmliche Markierung von Kryosubstraten gemäß Figur 27 besitzt die folgenden Nachteile. Es wird zwar die Identifizierung von Proben ermöglicht, damit wird aber lediglich eine Positionsinformation gegeben. Der beschränkte Informationsgehalt der Substratmarkierung stellt jedoch ein Problem dar, da neben der Probenidentifizierung auch zusätzliche Daten, z. B. über die Beschaffenheit oder die Vorgeschichte der Probe oder über Messergebnisse verfügbar sein sollen. Diese Daten könnten zwar in einer parallel betriebenen Datenbank gespeichert werden. Der getrennte Betrieb von Kryo- und Datenbanken stellt aber ein erhebliches Risiko für die Sicherheit der Merkmalszuordnung zu den einzelnen Proben dar. Dieses Risiko ist insbesondere bei humanmedizinischen Anwendungen kritisch, da eine Probenverwechslung den Erfolg einer weiteren Verwendung der Kryptrobe vereiteln kann. Außerdem besitzt die Substratmarkierung den Nachteil, dass eine Probenidentifizierung nur im Verbund mit dem Kryosubstrat möglich ist. Wenn eine Probenentnahme erfolgt, wie es bspw. in DE-OS 199 21 236 beschrieben wird, kann nach Trennung vom Kryosubstrat eine Probenidentifizierung nur durch eine aufwendige Messung von Probeneigenschaften im aufgetauten Zustand erfolgen.

Aus DE-OS 197 52 085 ist ein Probenträger für mikroskopische Untersuchungen an einer Vielzahl von Proben bekannt. Der herkömmliche Probenträger wird durch ein in Figur 28 (Stand der Technik) in schematischer Draufsicht gezeigtes Substrat mit einer Vielzahl von Probeaufnahmeräumen gebildet. Das Substrat besitzt bspw. die Form eines Plattenspeichers (z. B. CD). Zwischen einem in der Substratmitte befindlichen Durchgangsloch und den matrixartig angeordneten Probeaufnahmeräumen ist ein

Ringbereich gebildet. Aus DE-OS 197 52 085 ist bekannt, diesen Ringbereich zu Speicherung von Probandaten auszugestalten. Der herkömmliche Probenträger besitzt den Nachteil, lediglich zur Aufnahme von flüssigen Proben und nicht für die Kryokonservierung ausgelegt zu sein. Außerdem stellt die Speicherung von Probandaten auf dem Innenring die selben Nachteile dar, wie die o. g. Substratmarkierung. Es können zwar mehr Daten gespeichert werden, die Zuordnung zu den einzelnen Proben ist jedoch nicht fehlerfrei möglich.

Neben den genannten Nachteilen der herkömmlichen Techniken gibt es des Weiteren den folgenden Grund für die bisher gering entwickelte Anwendung der Kryokonservierung insbesondere in der zellulären Biotechnologie. Wenn ein direktes Einfrieren biologischer Proben in einer flüssigen Kühlphase (z. B. Stickstoff) erfolgt, besteht ein Kontaminationsrisiko. Über die Kühlphase können Viren auf die Proben übertragen werden. Um dieses Risiko zu vermeiden, muss der Kontakt mit der flüssigen Phase vermieden oder für eine dichte Abdeckung der Proben gesorgt werden. Dies ist bisher jedoch nicht in praktikabler Weise realisiert worden.

Aus der Labortechnik sind Probenträger, z. B. in Form von Objektträgern oder Mikrotiterplatten bekannt, die mit Datenspeichern ausgestattet sind. Diese herkömmlichen Probenträger sind für eine Kryospeicherung nicht geeignet. Erstens sind sie lediglich für eine Nutzung bei Raumtemperatur oder einer Külschranktemperatur oberhalb des Gefrierpunkts von Wasser ausgelegt. Eine Verwendung bei tieferen Temperaturen war bisher nicht vorgesehen. Zweitens sind herkömmliche Probenträger als Substrate für Proben vorgesehen. Auf den Substraten erfolgt beispielsweise eine Behandlung, Manipulierung oder Kultivierung von Proben. Für eine Lagerung oder Speicherung im konser-

vierten Zustand sind die herkömmlichen Probenträger jedoch nicht geeignet. Hierzu werden bisher Behälter zur Kryokonservierung verwendet, wie sie oben genannt sind. Schließlich sind die herkömmlichen Probenträger nicht für eine effektive Probenlagerung und -handhabung geeignet. In der Regel müssen sie manuell transportiert werden, eine Lagerung mit hoher Dichte ist ausgeschlossen.

Die Aufgabe der Erfindung ist es, ein verbessertes Verfahren zur Kryokonservierung bereitzustellen, mit dem die Nachteile der herkömmlichen Techniken überwunden werden, das einen erweiterten Anwendungsbereich besitzt und insbesondere für automatisierte Konservierungsanlagen geeignet ist. Das neue Verfahren zur Kryokonservierung soll insbesondere ermöglichen, dass Probendaten in größerem Umfang und mit erhöhter Datensicherheit (d. h. mit erhöhter Sicherheit der Zuordnung von Probendaten zu bestimmten Proben) den Proben zugeordnet werden. Die Erfindung soll auch eine hochspezifische Datenzuordnung zu einzelnen Kryoproben ermöglichen. Die Aufgabe der Erfindung ist es auch, Vorrichtungen zur Umsetzung derart verbesserter Kryokonservierungsverfahren anzugeben.

Diese Aufgaben werden mit Verfahren oder Vorrichtungen mit den Merkmalen gemäß den Patentansprüchen 1, 12, 21 und 22 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Anwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Die Grundidee der Erfindung ist es, mindestens eine Probe auf einem Substrat anzuordnen und auf dem Substrat eine Speicherung von Probendaten vorzunehmen, die für Merkmale der Kryoprobe charakteristisch sind. Die Speicherung der Probendaten erfolgt positionsspezifisch in einem Probendatenspeicher vorzugsweise an der Ablageposition der jeweiligen Probe. Durch

die Ablage von Proben und Probendaten an gemeinsamen oder eng benachbarten oder aneinandergrenzenden Positionen des Substrates werden eine Reihe von Vorteilen erzielt. Die Probendaten sind durch ihre Ablageposition eindeutig den jeweiligen Proben zugeordnet. Eine Verwechslung der Probenzuordnung wird ausgeschlossen. Bei Entnahme von Proben können simultan am Ablageort die zugehörigen Daten abgelesen oder mit dem Speichermedium vom Substrat entfernt, so dass auch nach der Probenentnahme bei der weiteren Verarbeitung die Identifizierung der Probe und die Zuordnung der Probendaten sichergestellt ist. Es kann eine Entnahme von einzelnen Proben bei beliebigen Temperaturen, insbesondere auch im gefrorenen Zustand, erfolgen.

Ein wesentlicher Fortschritt, der mit der Erfindung erzielt wird, besteht darin, dass erstmalig eine Verfahrensweise und geeignete Vorrichtungen bereitgestellt werden, die optimal für eine Speicherung, Konservierung oder Lagerung biologischer Proben über lange Zeiträume (Monate und Jahre) bei tiefen Temperaturen (z. B. unterhalb  $-50^{\circ}\text{C}$ ) eingerichtet sind. Mit der Erfindung wird für die Verwendung von Datenspeichern ein neuer Anwendungsbereich bei Betriebstemperaturen erschlossen, der vor der Erfindung nicht benutzt wurde.

Anwendungsabhängig können die Probenablage und die Datenspeicherung bei Raumtemperatur mit anschließender Abkühlung zur jeweils erforderlichen Konservierungstemperatur oder auch im gekühlten Zustand erfolgen. Die Erfinder haben überraschenderweise festgestellt, dass sowohl ein Schreiben als auch ein Lesen von Daten in oder aus an sich bekannten Speichermedien (z. B. optische Speicher, magnetische Speicher, elektromagnetische Speicher, FLASH-Speicher) oder in speziell für die Aufgaben der Kryospeicherung ausgelegten Speichermedien selbst bei Konservierungstemperaturen unterhalb des Gefrierpunktes des Was-

sers möglich sind. Die Probendatensätze sind in allen Phasen eines Kryokonservierungsvorganges zuverlässig lesbar. Die Lesbarkeit von Datenspeichern bei derart tiefen Temperaturen, dass gegebenenfalls ein Beschreiben ausgeschlossen ist, stellt einen von der Erfindern erkannten Vorteil dar, der zur erweiterten Anwendbarkeit der erfindungsgemäßen Kryospeicherung beiträgt.

Besondere Vorteile besitzt die Erfindung bei der Ablage einer Vielzahl von Proben auf einem gemeinsamen Speichersubstrat mit einer positionsspezifischen Speicherung einer Vielzahl von Probendatensätzen. Das Speichersubstrat dient gleichzeitig als Kryosubstrat mit Probenträgern zur Aufnahme, Halterung und Freigabe von Kryoproben und als Datenträger, der wie ein für die Computertechnik bekanntes Speichermedium eine Vielzahl von Daten an den Substratpositionen entsprechend den jeweiligen Probenpositionen speichert. Die Proben werden portionsweise (z. B. tropfenweise) und zueinander isoliert als Zellsuspensionsvolumina (z. B. als Zellsuspensionstropfen) auf oder in die Probenträger des Kryosubstrates aufgebracht. Jedem Probenträger ist ein Probendatenspeicher zugeordnet, in dem zugehörige Daten abgelegt werden. Die gleichzeitige Ablage von Proben und Probendaten erfolgt langzeitstabil und verwechslungssicher. Die erfindungsgemäße Kryokonservierung wird wegen der Analogie zur elektronischen Datenspeicherung hier als Kryospeicherung bezeichnet.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Kryospeicherung auf einem Speichersubstrat mit mindestens einem Kryospeicherelement. Jedes Kryospeicherelement umfasst einen Probenträger und einen Probendatenspeicher, die somit ein integrales Bauteil bilden, dass reversibel oder irreversibel vom Substrat lösbar ist. Der Probenträger und der Proben-



datenspeicher bilden einen festen Verbund, der zur Kryospeicherung lösbar am Speichersubstrat befestigt ist. Um eine Probe vom Speichersubstrat zu entnehmen, wird das gesamte Kryospeicherelement vom Speichersubstrat gelöst. Gegenstand der Erfindung ist auch das Kryospeicherelement an sich, das einen Probenträger zur Aufnahme einer Kryoprobe und einen Probandatenspeicher zur Ablage zugehöriger Probandaten umfasst. Ein Speichersubstrat wird gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung durch einen Grundkörper, der vorzugsweise eine flächige Gestalt besitzt, mit einer Vielzahl von Kryospeicherelementen gebildet. Das Speichersubstrat kann anwendungsabhängig eine vorbestimmte 2- oder 3-dimensionale geometrische Form besitzen. Gemäß bevorzugter Ausführungsformen der Erfindung hat der Grundkörper des Speichersubstrates die Gestalt einer optischen Speicherplatte (CD-ROM), in die die Kryospeicherelemente integriert sind, oder mindestens einer Leiterplatte, auf der die Kryospeicherelemente wie elektrische Schaltkreise (Chips) aufgesetzt sind.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zum Betreiben einer Kryobank mit einer Vielzahl von Speichersubstraten. Auf mindestens einem Speichersubstrat werden eine Vielzahl von Proben abgelegt, die bspw. zu einem Organismus (Probanden) gehören. Die Proben umfassen bspw. eine oder mehrere spezifische Zellen des Probanden (z. B. Stammzellen, Gewebezellen). Die Ablage der Proben erfolgt zunächst gemeinsam mit den probenspezifischen Daten, insbesondere Daten zur Identifizierung der Art der Proben und des Probanden, des Konservierungszeitpunktes und der zum Zeitpunkt der Konservierung vorliegenden Messdaten. Im Verlauf des Betriebes der Kryobank werden Proben gemeinsam mit den zugehörigen Probandaten für Messzwecke, diagnostische Aufgaben oder therapeutische Verfahren entnommen und/oder weitere Proben oder Probandaten ergänzt. Die Proben-

daten umfassen allgemein alle Merkmale und Parameter der Proben und des Probenspenders und ggf. Zusatzinformationen zur Datenablage auf dem Speichersubstrat. Ein erfindungsgemäß verwendeter Probendatenspeicher besitzt beispielsweise eine Speicherkapazität von mindestens 4 Megabyte.

Durch die folgenden vorteilhaften Merkmale der erfindungsgemäßen Kryospeicherung werden die Nachteile herkömmlicher planarer oder dreidimensionaler Substrate überwunden. Die Proben (z. B. eingefrorenen Zellsuspensionsvolumina) sind zu jedem Zeitpunkt spezifisch zugänglich. Dies gilt auch für den Tieftemperaturzustand. Es können an definierten Substratpositionen kleinste Probenvolumina angeordnet werden, die charakteristische Dimensionen im mm-Bereich oder darunter, vorzugsweise jedoch typische Größen von  $10^3 \mu\text{m}^3$  ( $10 \cdot 10 \cdot 10 \mu\text{m}^3$ ) bis zu einigen  $10 \text{ nm}^3$  besitzen. Die Proben können bspw. eine oder eine Vielzahl von Zellen ( $10^5$  bis  $10^6$  Zellen), Zellbestandteile, biologisch relevante Objekte (wie z. B. Membranvesikeln, DNA-Materialien, Makromoleküle) und/oder Zellverbände enthalten. Die Proben können mit einer hohen Dichte angeordnet werden, die Kryospeicherung besitzt eine erhöhte Effektivität.

Die Proben können selektiv im tiefgeköhlten Zustand des Speichersubstrates entnommen werden, ohne dass die Kühlung der übrigen Proben unterbrochen wird. Zur Probenabnahme und zum Datenauslesen ist kein Auftauen des gesamten Speichersubstrates erforderlich.

Die Probendaten können automatisch computergestützt geschrieben oder gelesen werden. Die Zuordnung von Probendatenspeichern und Probenträgern ist eindeutig. Die Proben werden verwechslungssicher abgelegt. Die Zuordnung entnommener Proben zu den Probendaten und auch zum Speichersubstrat bleibt erhalten,

so dass die Historie einer Probe rekapituliert werden kann. Dies stellt einen besonderen Vorteil bei medizinischen Anwendungen der Erfindung dar.

Erfindungsgemäße Kryospeicherelemente werden vorzugsweise unter Verwendung tieftemperaturverträglichen Kunststoffmaterials hergestellt, das einerseits den Probenträger und andererseits eine Einbettung für den Probandenspeicher bildet. Das Kunststoffmaterial kann ohne Veränderung und ohne Schaden wiederholte Temperaturwechsel tolerieren. Es wird vorzugsweise ein Kunststoffmaterial verwendet, dessen Wasseraufnahmefähigkeit  $< 1\%$  der Eigenmasse, insbesondere  $< 0.1\%$  der Eigenmasse beträgt. Erfindungsgemäße Kryospeicherelemente basieren beispielsweise auf Polyurethan, Polytetrafluorethylen oder Polyethylen. Erfindungsgemäße Speichersubstrate besitzen vorteilhafterweise eine hohe mechanische Stabilität und Langzeithaltbarkeit. Die erfindungsgemäße Kryospeicherung ermöglicht erstmalig eine sichere Ablage von biologischen Proben über Jahrzehnte. Eine Kryobank kann über die gesamte Lebensdauer eines Probanden, z. B. für die Dauer eines Menschenalters, zuverlässig betrieben werden. Das Speichersubstrat besitzt einen relativ einfachen Aufbau, der einen massenhaften Einsatz von Speichersubstraten in Kryobanken ermöglicht.

Die Erfindung besitzt auch Vorteile in Bezug auf das genannte Kontaminationsrisiko. Die erfindungsgemäßen Speichersubstrate ermöglichen eine Reihe von unten erläuterten Maßnahmen, mit denen verhindert wird, dass ein flüssiges Kühlmedium direkt mit den Proben in Verbindung kommt. Eine virale Kontamination über die Kühlphase wird vermieden. Es wird auch der Niederschlag von Wasser oder anderen Substanzen auf den Proben ausgeschlossen.

Ein weiterer wichtiger Vorteil erfindungsgemäßer Speichersubstrate besteht darin, dass die abgelegten Proben im kryokonservierten oder aufgetauten Zustand den üblichen Mess- und Analysemethoden (z. B. optische Messungen, mikroskopische Beobachtungen) bei gleichzeitiger Lesbarkeit der Datensätze zugänglich sind. Die Daten in den Probendatenspeichern werden auch bei mehrmaligen Einfrier- oder Auftauvorgängen aufrechterhalten.

Die Kryospeicherung erfolgt bei anwendungsabhängig gewählten Konservierungsbedingungen. Die Temperatur der Kryospeicherung und der zeitliche Ablauf von Temperaturabsenkung oder -steigerungen werden in Abhängigkeit von der Konservierungsaufgabe und dem Material gewählt. Die Konservierungstemperatur liegt im Bereich unterhalb der Raumtemperatur, vorzugsweise unterhalb des Gefrierpunktes von Wasser bei Normaldruck und bei den bevorzugten Langzeitanwendungen unterhalb von  $-80^{\circ}\text{C}$ . Die Kryotemperatur wird vorzugsweise durch ein flüssiges Kühlmedium (Stickstoff) oder den Dampf des Kühlmediums eingestellt.

Die Erfindung besitzt den Vorteil, dass kleinste Probenvolumina kryokonserviert werden. Dies ermöglicht schnelle Temperaturänderungen, reproduzierbare Konservierungsbedingungen und eine individuelle Probenhandhabung, -behandlung oder -messung.

Weitere Vorteile und Einzelheiten der Erfindung werden im Folgenden unter Bezug auf die beigefügten Zeichnungen beschrieben. Es zeigen:

Figur 1                      eine schematische Schnittansicht eines  
Teils eines erfindungsgemäßen Speichersub-

strates gemäß einer ersten Ausführungsform der Erfindung,

Figur 2 eine schematische Illustration der Probenentnahme von einem Speichersubstrat gemäß Figur 1,

Figuren 3 bis 7 schematische Draufsichten auf verschiedenen Gestaltungen von Proben- und Speicheranordnungen auf einem Speichersubstrat,

Figur 8 eine schematische Schnittansicht eines Teils eines Speichersubstrates gemäß einer zweiten Ausführungsform der Erfindung,

Figur 9 schematische Ansichten verschiedener geometrischer Anordnungen von Kryospeicherelementen,

Figur 10 eine schematische Schnittansicht eines Teils eines Speichersubstrates gemäß einer dritten Ausführungsform der Erfindung,

Figur 11 eine Illustration der Entnahme von Kryospeicherelementen aus einem erfindungsgemäßen Speichersubstrat gemäß einer vierten Ausführungsform der Erfindung,

Figur 12 eine schematische Illustration einer folienförmigen Abdeckung an einem erfindungsgemäßen Speichersubstrat,

- Figur 13 eine schematische Schnittansicht eines Teils eines Speichersubstrates gemäß einer fünften Ausführungsform der Erfindung,
- Figur 14 schematische Perspektivansichten von Speichersubstraten gemäß einer sechsten Ausführungsform der Erfindung,
- Figur 15 eine schematische Perspektivansicht eines Kryospeicherelementes des Speichersubstrates gemäß Figur 14, und
- Figur 16 eine schematische Perspektivansicht einer Abwandlung des Kryospeicherelementes gemäß Figur 15,
- Figuren 17 bis 20 schematische Perspektivansichten erfindungsgemäßer Kryospeicherelemente gemäß weiteren Ausführungsformen der Erfindung,
- Figuren 21 und 22 schematische Illustrationen der Beschickung von Probenträgern und der Entnahme von Proben,
- Figuren 23 bis 26 schematische Perspektivansichten erfindungsgemäßer Speichersubstrates gemäß weiteren Ausführungsformen der Erfindung, und
- Figuren 27 und 28 Draufsichten herkömmlicher Probenträger (Stand der Technik).

Erfindungsgemäß wird mindestens eine Probe in einem Probenträger auf einem Substrat angeordnet und auf dem Substrat eine

Speicherung von Probandaten vorgenommen, die für Merkmale der Kryoprobe charakteristisch sind. Die Speicherung der Probandaten erfolgt positionsspezifisch in einem Probandatenspeicher vorzugsweise an der Ablageposition der jeweiligen Probe. Der Verbund aus einem Probenträger zur Aufnahme einer Kryoprobe und einem Probandatenspeicher zur Ablage zugehöriger Probandaten wird als Kryospeicherelement bezeichnet. Ein erfindungsgemäßes Speichersubstrat wird vorzugsweise durch einen Grundkörper, der vorzugsweise eine flächige Gestalt besitzt, mit einer Vielzahl von Kryospeicherelementen gebildet.

Bei der in Figur 1 dargestellten ersten Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Speichersubstrates 100 ist ein Grundkörper 110 vorgesehen, der eine Vielzahl von Kryospeicherelementen 120 trägt. Der Grundkörper 110 (ausschnittsweise dargestellt) besitzt typische Dimensionen wie z. B. eine optische lesbare/beschreibbare Speicherplatte (im Folgenden: CD, Durchmesser z. B. rund 12 cm). Zur Aufnahme der Kryospeicherelemente 120 besitzt der Grundkörper 110 Durchtrittöffnungen 111, in denen die Kryospeicherelemente in Art einer Presspassung sitzen. Auf einer Seite des Grundkörpers 110 ist ein schichtförmiges Speichermedium 112 angeordnet. Das Speichermedium 112 ist eine Datenschicht, wie sie von herkömmlichen CD's bekannt und zum Schreiben und Lesen von Daten geeignet ist. Das Speichermedium 112 ist vorzugsweise zum optischen Schreiben („Brennen“) und Lesen der Daten ausgelegt. Es kann aber auch ein magnetisches oder ein topographisches Speichermedium vorgesehen sein. Auf dem Speichermedium 112 ist ggf. eine Schutzschicht vorgesehen (nicht dargestellt).

Das Speichermedium 112 umfasst Schichtbereiche, die auf dem Grundkörper 110 aufliegen und als Basisspeicher 113 dienen, und Bereiche, die zu den Kryospeicherelementen 120 gehören und

als Probendatenspeicher 122 dienen. Die Basisspeicher 113 und Probendatenspeicher 122 können zunächst eine geschlossene Schicht des Speichermediums 112 bilden, die nach Probenentnahmen (siehe Figur 2) ggf. unterbrochen wird. Der Basisspeicher 113 enthält vorzugsweise Substratdaten, die sich bspw. auf die Art der Anordnung der Kryospeicherelemente und die Identifizierung des Substrates beziehen. Die Probendatenspeicher 122 enthalten Probendaten (siehe unten).

Die Kryospeicherelemente 120 bestehen jeweils aus einem Probenträger 121 und dem Probendatenspeicher 122. Der Probenträger 121 ist ein Formteil aus Kunststoff mit einer T- oder teller-/pilzförmigen Gestalt. Der Probenträger kann anstelle von Kunststoff aus einem biokompatiblen und inerten Material (z. B. Halbleitermaterial) bestehen. Der Probenträger 121 umfasst eine plattenförmige Probenaufnahme 123 und einen Trägerstift 124. Die innere Form der Durchtrittsöffnungen 111 und die äußere Form des Trägerstifts 124 sind zur Bildung einer Presspassung aufeinander abgestimmt. Zwischen den Rändern der Probenaufnahmen 123 sind Abstände 125 gebildet. Die Abstände 125 verringern das Risiko einer gegenseitigen Kontamination zwischen den Proben. Außerdem vereinfachen sie die Entnahme von Kryospeicherelementen. Mit den Trägerstiften 124 ist jeweils ein Probendatenspeicher 122 fest verbunden.

Auf den Probenaufnahmen 123 befinden sich die Kryoproben 130, insbesondere in Form von gefrorenen Flüssigkeitstropfen. Die Tropfen sind Zellsuspensionen oder auch Referenzproben, z. B. mit Mustern von Kultivierungsmedien, Lösungen von Markierungsfarbstoffen oder Sondenproben. Sondenproben sind Referenzproben, die Substanzen enthalten, die auf eine Änderung kritischer Umgebungsbedingungen empfindlich reagieren. Als Sondenproben können bspw. chemische Verbindungen verwendet werden, die empfindlich gegenüber radioaktiver Strahlung oder



die empfindlich gegenüber radioaktiver Strahlung oder unerwünschten Temperaturerhöhungen sind. Eine Kontrolle der Sondenproben ermöglicht eine Überprüfung des Lagerungszustandes des Speichersubstrates in einer Kryobank.

Über den Kryoproben 130 ist eine Abdeckfolie 114 angeordnet, die der Vermeidung von Kontaminationen aus dem Kühlmedium oder aus der sonstigen Umgebung dient. Typische Dimensionen der Probenaufnahmen 123 sind bspw. 0.1 bis 3 mm. Die Gesamtdicke des Speichersubstrates 100 beträgt bspw. rd. 2 mm.

Zur erfindungsgemäßen Kryospeicherung von Proben wird ein Speichersubstrat 100 (ohne die Abdeckfolie 114) zunächst mit den Kryoproben und ggf. Referenzproben beschickt. Die Beschickung erfolgt bspw. mit einer Mikrotropfenschusseinrichtung, wie es in EP-B 0 804 073 beschrieben ist. Die Proben werden als Mikrotropfen im gekühlten Zustand des Speichersubstrates 100 gezielt auf die Probenaufnahmen 123 aufgeschossen, wo sie beim Auftreffen festfrieren. Ebenfalls im tiefgeköhlten Zustand des Speichersubstrates 100 erfolgt ein Einschreiben z. B. Einbrennen) erster Probendaten in die Probendatenspeicher 122. Nach Beschickung des Substrates erfolgt die Aufbringung der Abdeckfolie 114 und die Einbringung des Speichersubstrates 100 in eine Halterung unter den jeweiligen Kühlbedingungen des verwendeten Kryokonservierungssystems.

In Figur 2 ist die Entnahme von Proben vom Speichersubstrat 100 illustriert. Erfindungsgemäß erfolgt die Probenentnahme durch Abtrennen des jeweiligen Kryospeicherelementes 120 vom Grundkörper 110. Das Abtrennen erfolgt mit einer Stanzeinrichtung 140 in Zusammenarbeit mit einer Stempelinrichtung 150. Die Stanzeinrichtung besitzt ein hohles Schneidwerkzeug 141, dessen Schneide 142 an die äußere Form der Probenaufnahme 123

angepasst ist. Das Stanzwerkzeug kann bspw. durch eine Hohlkappillare mit einem angeschliffenen Ende gebildet werden. Die Stempleinrichtung 150 besitzt einen Stempel 151, mit dem der Probedatenspeicher 122 vom übrigen Speichermedium 112 abgetrennt und der Trägerstift 124 aus der Durchtrittsöffnung 111 herausgedrückt werden kann. Am Ende des Stempels 151 ist ggf. auch ein Schneidwerkzeug zur verbesserten Durchtrennung des Speichermediums 112 vorgesehen. Die Stanz- und Stempleinrichtungen 140, 150 können zur Aufrechterhaltung einer bestimmten Temperatur des Speichersubstrates 100 aktiv oder passiv gekühlt sein.

Figur 2 zeigt einen besonderen Vorteil der Erfindung. Mit der Stanzeinrichtung 140 wird die Probe 130 mit dem Kryospeicherelement 120 entnommen, ohne dass andere Probendepots geöffnet werden. Die Probe 130 ist auch nach der Entnahme mit dem Probedatenspeicher 122 verbunden. Es kann eine Übertragung der Probe auf ein anderes Speichersubstrat und/oder eine Messeinrichtung unter Kryobedingungen oder bei erhöhter Temperatur erfolgen. Eine Ergänzung von Probendaten, z. B. in Abhängigkeit von einem Messergebnis, wird am Probedatenspeicher 122 vorgenommen (Datenakkumulation).

Die Figuren 3 bis 7 illustrieren erfindungsgemäße Speichersubstrate (z. B. gemäß Figur 1) in schematischer Draufsicht. Ein Speichersubstrat 100 ist wie eine herkömmliche CD geformt und besitzt insbesondere in der Mitte eine Durchtrittsöffnung 101 zur Anbringung des Speichersubstrates in der Kryokonservierungsvorrichtung und/oder einem Lese-/Schreibsystem. Die Probenaufnahmen 123 der Probenträger sind bei dieser Ausführungsform rechteckig gebildet. Sie besitzen typische Dflächendimensionen von rd. 0.1 bis 30 mm<sup>2</sup>. Die Probenaufnahmen 123 sind gruppenweise in Sektoren 102 angeordnet. Bei Entnahme von Pro-

ben mit den jeweiligen Kryospeicherelementen bleibt der Grundkörper 110 mit den freien Durchtrittsöffnungen 111 zurück.

Figur 4 zeigt eine abgewandelte Ausführungsform mit kreisförmigen Probenaufnahmen 123. Auf jeder Probenaufnahme 123 kann ein Tropfen mit einem Volumen von einigen  $\text{mm}^3$  abgelegt werden. Jeder Tropfen kann bis zu  $10^5$  Zellen enthalten. Auf dem gesamten Speichersubstrat mit einem Durchmesser von ca. 12 cm können damit bis zu  $10^8$  Zellen abgelegt werden.

Figur 5 zeigt eine abgewandelte Gestaltung mit kreisförmigen Probenaufnahme 123, die im Vergleich zu Figur 4 kleinere Durchmesser besitzen (z. B. 0.01 bis 1 mm). Die Gesamtzahl der Kryospeicherelemente auf dem Speichersubstrat 100 wird dadurch erhöht. Die Variabilität bei der Probenentnahme steigt.

Die in Figur 1 illustrierten Basisspeicher 113 können auch selektiv entsprechend bestimmter Bahnen im Speichermedium angeordnet sein. Dies ist in den Figuren 6 (ringförmige Speicherbahnen) und 7 (strahlförmig ausgerichtete Speicherbahnen) illustriert. Mit den Basisspeichern 113 erfolgt eine zusätzliche Fragmentierung des Speichersubstrates.

Figur 8 illustriert ausschnittsweise eine abgewandelte Form eines Speichersubstrates 200 mit einem Grundkörper 210, der durch die Probenträger 221 der Kryospeicherelemente gebildet wird. Die Probenträger 221 besitzen auf einer Seite die Probendatenspeicher 222 und auf der entgegengesetzten Seite die Probenaufnahmen 223. Die Probenträger 221 sind Formteile, z. B. aus Kunststoff oder einem Halbleitermaterial, in denen die Probenaufnahmen 223 als Ausnehmungen gebildet sind. Die Probenträger 221 sind über Sollbruchstellen 224 miteinander verbunden. Die Probendatenspeicher 222 bilden eine auf der Unter-

seite des Grundkörpers 210 angeordnete Schicht des Speichermediums. Auf der Oberseite des Speichersubstrates ist eine Abdeckfolie 214 vorgesehen, mit der die Proben 230 abgedeckt werden. Die Abdeckfolie 214 umgreift den Grundkörper 210 an seiner Außenkante mit einem umlaufenden Vorsprung 215.

Die Verwendung des Speichersubstrates 200, insbesondere die Beschickung und die Datenspeicherung erfolgen nach den oben erläuterten Prinzipien. Zur Probenentnahme werden Kryospeicherelemente 220 jeweils mit einem Träger 221 und einem Probendatenspeicher 222 mit einem geeigneten Werkzeug vom Speichersubstrat 200 getrennt (z. B. herausgebrochen, abgeschnitten oder dergleichen). Anwendungsabhängig sind die Sollbruchstellen 224 mit einer bestimmten Geometrie ausgeführt, wie dies in Figur 9 illustriert ist.

In Figur 9 bezeichnen die weißen Linien den Verlauf der Sollbruchstellen 224. In den jeweils umrahmten schwarzen Bereichen befinden sich die Probenträger insbesondere mit den Probenaufnahmen. Die Probenaufnahmen können innerhalb des Speichersubstrates 200 verschiedene Geometrien besitzen, z. B. nach innen hin enger (linkes Teilbild) oder schmaler werden (rechtes Teilbild).

Eine dritte Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Speichersubstrates 300 ist in Figur 10 illustriert. Das Speichersubstrat besitzt einen scheibenförmigen Grundkörper 310 in Form einer ebenen, gleichförmigen Platte. Einfügungen oder Sollbruchstellen sind bei dieser Ausführungsform nicht vorgesehen. Die Kryospeicherelemente 320 bilden bei dieser Gestaltung lediglich eine Einheit, solange die Proben 230 auf dem Speichersubstrat 300 angeordnet sind. Als Probenträger 321 ist für jede Probe eine Probenaufnahmeschicht vorgesehen. Die Probenauf-

nahmeschicht besteht aus einem Kunststoffmaterial, das eine geringe Haftung zum Grundkörper 310 besitzt (z. B. aus PTFE oder Kautschuk). Die geringe Haftung ist insbesondere im Tieftemperaturbereich gegeben.

Zur Abtrennung einer Probe 330 wird die Probe mit der Probenaufnahmeschicht mit einem geeigneten Werkzeug vom Grundkörper 310 abgetrennt (z. B. abgehoben, abgehobelt, abgeschoben oder abgezogen). Der Probendatenspeicher 322 verbleibt auf der Substratunterseite.

Die Proben 330 sind auch bei dieser Ausführungsform mit einer Abdeckung 314 gegen Kontaminierungen geschützt. Die Abdeckung 314 wird durch einen Deckel gebildet, der gegenüber dem Grundkörper 310 über eine Ringdichtung 315 abgedichtet ist.

In Figur 11 ist im oberen Teilbild in perspektivischer Ansicht ein Ausschnitt eines Speichersubstrates 400 gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung dargestellt. Bei diesem Speichersubstrat sind die Kryospeicherelemente 420 in Form einer Vorperforation oder einer Presspassung im Grundkörper 410 vorgesehen. Der Grundkörper 410 und die Kryospeicherelemente 420 bilden eine ebene Platte, auf deren Unterseite das Speichermedium 412 schichtförmig angeordnet ist. Das Speichermedium 412 (Datenträgerfolie) kann ebenfalls vorperforiert sein und befindet sich auf der Unterseite des Grundkörpers 410 mit der zum optischen Ein- und Auslesen von Daten erforderlichen Planarität.

Im unteren Teilbild von Figur 11 ist das Kryospeicherelement 420 vergrößert dargestellt. Auf der Oberseite des Grundkörpers 410, der hier den Probenträger 421 bildet, ist als Probenaufnahme 423 eine Ausnehmung vorgesehen. In der Probenaufnahme

ist die Kryoprobe 430 (z. B. Suspensionstropfen) angeordnet. Mit der Abdeckfolie 414 ist die Probe 430 gegen Kontamination geschützt. Auch an der Abdeckfolie 414 können Perforationen entsprechend der äußeren Form des Kryospeicherelements 420 vorgesehen sein. Erfindungsgemäß kann allgemein die Abdeckung oder Abdeckfolie auch als Speichermedium gebildet sein. Bei Entnahme des Kryospeicherelements 420 aus dem Speichersubstrat 400 mit einem analog zur Illustration in Figur 2 aufgebauten Werkzeug wird die Probe 430 mit dem Probenträger 421, dem Probandatenspeicher 422 und dem Ausschnitt der Abdeckfolie 414 entnommen. Das Speichersubstrat 400 wird in einer Halterung fixiert und mit dem passgenauen Stempel 451 (ggf. mit Schneide 452) und der Stanzeinrichtung 440 vom Grundkörper 410 getrennt. Die Stanzeinrichtung 440 ist mit einem beweglichen Stempel 441 versehen, der nach Abtrennung des Kryospeicherelementes 420 dieses aus der Stanzeinrichtung herausdrückt.

Figur 12 zeigt eine gegenüber Figur 11 abgewandelte Ausführungsform am Beispiel eines einzelnen Kryospeicherelementes 420 mit dem Probenträger 421 und der Probenaufnahme 423. Bei dieser Gestaltung ist die Abdeckung 414 durch eine zweischichtige Folie gebildet. Auf dem Probenträger 421 liegt eine poröse Schicht 415 als Abdeckung auf. Darüber befindet sich eine dichte Schicht 416 mit einer aus der Substratebene abstehenden Verlängerung 417. Die Verlängerung 417 kann manuell oder mit einem entsprechenden Werkzeug vom Substrat weggezogen werden. Dabei wird die untere Schicht 415 am Probenträger 421 freigelegt. Diese Prozedur kann im tiefgefrorenen oder auch im aufgetauten Zustand erfolgen. Die Probenaufnahme 423 wird zeitweilig teilweise geöffnet. Es kann ein rascher Austausch der Flüssigkeit in der Probenaufnahme 423 erfolgen. Es können bspw. Kryoprotektive aus der Zellsuspension ausgewaschen werden.

Die Abdeckung 414 kann auch Daten oder Markierungen zur Identifizierung der Probe enthalten. Gemäß abgewandelten Gestaltungen kann ein aus weiteren Schichten gebildeter Aufbau der Abdeckung 414 vorgesehen sein.

Das Prinzip der mehrschichtigen Abdeckung ist auch in Figur 13 am Beispiel einer weiteren Ausführungsform der Erfindung gezeigt. Da Speichersubstrat 500 umfasst wiederum einen Grundkörper 510 mit pilzförmigen Vorsprüngen 511, auf denen die Probenträger 521 sitzen. Die Probenträger 521 sind Formteile jeweils mit einer Probenaufnahme 523 auf der Oberseite und einer Fixierausnehmung 524 auf der Unterseite. Die Fixierausnehmungen 524 und die Vorsprünge 511 wirken wie Druckknöpfe als lösbare mechanische Verbindungen zusammen. Auf der zu den Probenträgern 521 entgegengesetzten Seite befindet sich als Speichermedium 512 eine Datenträgerschicht, die die Probendatenspeicher 522 bildet, die den jeweiligen Probenträgern 521 zugeordnet sind. Die Abdeckung 514 erfolgt nach dem Doppelschichtprinzip, das in Figur 12 illustriert ist.

Zur Entnahme eines Probenträgers 521 im gefrorenen Zustand des Speichersubstrates 500 wird ein hobel- oder keilförmiges Werkzeug unter den Probenträger 521 geschoben. Mit dem Werkzeug wird die Verbindung zwischen dem jeweiligen Vorsprung 511 und der Fixierausnehmung 524 gelöst. Die Probe wird damit mit dem Probenträger 521 und Teilen der Abdeckung 514 vom Speichersubstrat 500 abgetrennt. Auch bei dieser Ausführungsform geht bei der Abtrennung die Verbindung zum Probendatenspeicher 522 verloren. Allerdings können Probendaten auch im entsprechenden Teil der Abdeckung 514 vorgesehen sein.

Die in den Figuren 14 bis 26 dargestellten Ausführungsformen der Erfindung zeichnen sich dadurch aus, dass das Speichersubstrat 600 durch mindestens eine Leiterplatte 610 gebildet wird, die dem Grundkörper entspricht und auf die ein oder mehrere Kryospeicherelemente 620 wie elektrische Schaltkreise (Chips) aufgesetzt sind. Die Leiterplatte 610 trägt elektrische (Leiterbahnen) oder optische (Lichtleiterfasern) Verbindungen 611, die jeweils eine Aufnahmefassung 612 zur Aufnahme von einem Kryospeicherelement mit einer externen (nicht dargestellten) Steuereinrichtung verbinden. Die Aufnahmefassung entspricht im Wesentlichen dem Sockel einer herkömmlichen Schaltkreisfassung, in dem die Kontakte des Kryospeicherelements (siehe z. B. Figur 15) eingesetzt werden. An den Aufnahmefassungen 612 können zusätzlich jeweils Schaltkreise zur Signalanpassung, Signalumsetzung oder Detektion der auf den Verbindungsleitungen 611 oder von auf optischem Wege strahlend gelieferten Datensignalen vorgesehen sein.

Die Verbindungsleitungen 611 können auf der Oberseite der Leiterplatte 610 mit den Aufnahmefassungen 612 (oberes Teilbild von Figur 14) oder auf der entgegengesetzten Seite (unteres Teilbild von Figur 14) vorgesehen sein. Im letzteren Fall könne die Aufnahmefassungen 612 dichter angeordnet werden. Das untere Teilbild von Figur 14 zeigt ferner, dass auf der Leiterplatte 610 auch ein Rechnerschaltkreis 613 zur Ansteuerung der Kryospeicherelemente, ggf. mit einem gesonderten RAM-Speicher, vorgesehen sein kann.

Jede Aufnahmefassung 612 ist zur Aufnahme eines Kryospeicherelementes 620 eingerichtet. Jedes Kryospeicherelement 620 umfasst analog zu den oben erläuterten Funktionen einen Proben-träger 621, der mit dem Probandatenspeicher 622 verbunden ist. Gemäß einer besonderes vorteilhaften Ausführungsform der Er-



findung wird das Kryospeicherelement durch einen an sich bekannten integrierten Schaltkreis (z. B. Speicherbaustein) gebildet. Der Schaltkreis enthält als Probendatenspeicher 622 mindestens einen RAM-Speicher. Das Kryospeicherelement 620 kann auch einen kompletten Rechnerschaltkreis enthalten, mit dem die Funktion des Kryospeicherelements verwaltet wird und über den das Kryospeicherelement nach außen kommuniziert. Der Probenträger 621 ist vorzugsweise in oder in Verbindung mit der Kunststoffabdeckung oder Verkapselung des integrierten Schaltkreises gebildet.

Die Probenaufnahme 623 ist z. B. gemäß Fig. 15 eine Ausnehmung in der Kunststoffabdeckung. Bei einem herkömmlichen Chip mit einer Größe von  $7 \cdot 14$  mm kann die Probenaufnahme 623 eine Grundfläche von ca.  $4 \cdot 10$  mm bei einer Tiefe von 1 mm besitzen. Bei diesen Maßen können im Kryospeicherelement 620 bis zu fünf Millionen Zellen untergebracht werden.

Auf dem Boden der Probenaufnahme 623 können zusätzliche Steuereinrichtungen zur Manipulierung der Probe Sensor- und/oder Anzeigeeinrichtungen 624 vorgesehen sein. Die Steuereinrichtungen umfassen ggf. Kühl- und Heizelemente, z. B. Peltier-Elemente, Widerstandsheizelemente, zur gesteuerten Abkühlung oder Erwärmung der Probe oder Materialien mit erhöhter Wärmekapazität zur Reduzierung der Wärmebelastung der Probe während eines Chiptransportes. Als Anzeigeeinrichtung kann eine Lichtquelle vorgesehen sein, die bspw. einen bestimmten Zustand des Kryospeicherelements 620 bzw. der Probe signalisiert oder die als Messlichtquelle für Messungen an der Probe 630 dient. Zusätzlich ist das Kryospeicherelement 620 mit einer Abdeckung 614 versehen, die die Probe von Kontamination, Verdunstung und Sublimation schützt. Die Abdeckung 614 ist bspw. eine Plastik- kappe, eine aufgeschweißte Folie oder ein anderes schichtför-

miges Bauteil, das eine dichte, lösbare Verbindung mit dem Probenträger 621 eingeht.

Der Probenträger 621 dient auch als Führung für die Kontaktfüße 625 des Kryospeicherelements. Die Kontaktfüße sind insbesondere mit dem Probendatenspeicher 622 und ggf. den Steuer- und Anzeigeeinrichtungen 624 verbunden.

Im Gegensatz zu den aus der zellulären Biotechnologie bekannten Diagnosechips besteht beim Kryospeicherelement 620 zwischen der Probe 630 und dem Probendatenspeicher 622, den Steuer- und/oder Anzeigeeinrichtungen 624 keine Verbindung, die auf eine Erfassung elektrischer Parameter der in der Probe eingefrorenen Zellen gerichtet ist.

Die Abdeckung 614 gemäß Figur 15 kann auch durch einen Kryobehälter 615 gemäß Figur 16 ersetzt werden. Mit dem Kryobehälter 615 wird die Oberseite des Probenträgers 621 als Gefäß gebildet, das analog zu einem herkömmlichen Kryogefäß aufgebaut ist. Es kann insbesondere ein Deckel 616 mit einer abgedichteten Schraubverbindung zum zylinderförmigen Behälterkörper 617 vorgesehen sein. Der Kryobehälter 615 besteht aus einem kälteresistenten Kunststoffmaterial. Die in Figur 16 dargestellte Ausführungsform der Erfindung besitzt den vor Vorteil, dass der Kryobehälter 615 auch manuell, z. B. durch Pipettieren, beschickt werden kann.

Einzelheiten weiterer Ausführungsformen erfindungsgemäßer Kryospeicherelemente 620 sind in den Figuren 17 bis 26 gezeigt. Das Kryospeicherelement 620 gemäß Fig. 17 umfasst einen Probenträger 621 und einen Probendatenspeicher 622. Der Probendatenspeicher 622 ist wie ein an sich bekannter elektronischer Speicherchip mit Kontaktelektroden 625 und einer Verkap-

selung 626 aufgebaut, in der ein Speicherschaltkreis und ggf. ein Rechnerschaltkreis angeordnet sind. Die Verkapselung 626 besteht typischerweise aus einem Kunststoffmaterial.

Der Probenträger 621 ist auf der Oberseite der Verkapselung 626 befestigt oder als Teil der Verkapselung 626 gebildet. Der Probenträger 621 besteht aus einem Kunststoffrahmen 627, in den zur Probenaufnahme mindestens ein Kryobehälter 615 integriert ist. Der Kunststoffrahmen 627 ist beispielsweise ein Spritzgussteil mit einer Größe entsprechend der Oberfläche der Verkapselung 626. Die seitlichen Rahmenteile sind mit Bohrungen versehen, in denen die Kryobehälter 615 angeordnet sind.

Jeder Kryobehälter 615 bildet mindestens eine langgestreckte Probenkammer. Die mindestens eine Probenkammer besitzt eine langgestreckte Form derart, dass der Innenquerschnitt wesentlich kleiner als ihre Längsausdehnung ist. Als Probenkammern sind beispielsweise Schläuche, Hohlنadeln, Kapillaren oder dgl. vorgesehen. Der Innendurchmesser einer Probenkammer liegt beispielsweise im Bereich von 5 µm bis 4 mm. Die Länge kann beispielsweise im Bereich von 0.5 cm bis 10 cm gewählt sein. Der Quotient aus Querschnittsdurchmesser und Länge einer Probenkammer ist vorzugsweise kleiner als 1/10. Die Bereitstellung von mindestens einem Kryobehälter 615 in Rohr- oder Schlauchform besitzt die Vorteile einer schnellen Beschickung oder Leerung der Probenkammern, einer hohen Miniaturisierbarkeit und einer hohen Einfriergeschwindigkeit.

Bei der in Fig. 17 illustrierten Ausführungsform der Erfindung ist zunächst ein Kryobehälter 615 durch einen mäanderförmig in den Rahmen 627 eingelegten Schlauch (teilweise dargestellt) gebildet. Nach Beschickung des Kryobehälters 615 über die Schlauchenden (siehe Pfeile) können die gestrichelt einge-

zeichneten Teile des Schlauches abgeschnitten werden, so dass die durchgezogen gezeichneten Abschnitte als getrennte Kryobehälter (z. B. 616) zurückbleiben. Alle Kryobehälter 615 sind einheitlich mit einer gemeinsamen Probe 630 beschickt, die vorteilhafterweise in Teilproben unterteilt ist. Mit einer mechanischen Trenneinrichtung 400 können die Teilproben (z. B. 616) vom Kryoelement 620 im gefrorenen oder im aufgetauten Zustand abgetrennt werden, ohne dass die übrigen Teilproben beeinflusst werden.

Auf der Oberfläche der Verkapselung 626 und/oder am Rahmen 627 der Probenaufnahme 623 können zusätzliche Steuereinrichtungen zur Manipulierung der Probe und/oder Sensor- und/oder Anzeigeeinrichtungen 624 vorgesehen sein. Die Steuereinrichtungen umfassen ggf. Kühl- und Heizelemente, z. B. Peltier-Elemente, Widerstandsheizelemente oder dgl. Sie dienen der gesteuerten Abkühlung oder Erwärmung der Probe oder Materialien mit erhöhter Wärmekapazität zur Reduzierung der Wärmebelastung der Probe, z. B. während eines Chiptransportes. Die Sensor- und/oder Anzeigeeinrichtungen können eine Lichtquelle aufweisen, die bspw. einen bestimmten Zustand des Kryospeicherelements 620 bzw. der Probe signalisiert oder als Messlichtquelle für Messungen an der Probe 630 dient.

Zusätzlich kann jedes Ende eines Kryobehälters 615 mit einer Abdeckung 614 versehen sein, die die Probe vor Kontamination, Verdunstung und Sublimation schützt. Die Abdeckung 614 ist bspw. eine Plastikkappe, eine aufgeschweißte Folie oder ein anderes Bauteil, das eine dichte Verbindung mit den Enden des jeweiligen Kryobehälters 615 eingeht. Ist als Kryobehälter ein Schlauch vorgesehen, so kann die Abdeckung auch durch einen Teil des Schlauches selbst gebildet sein, indem dieser an seinen Enden zugeklemmt wird.

Anstelle eines durchgehenden und ggf. zugeschnittenen Schlauches gemäß Fig. 17 können als Probenaufnahme 623 auch eine Vielzahl rohrförmiger Kryobehälter 615 aus einem starren Material vorgesehen sein, die quer (Fig. 17) oder parallel (Fig. 18) zur Längsausrichtung des Kryoelements 620 ausgerichtet sind. Bei der Ausführungsform gemäß Fig. 18 sind beispielsweise 5 Kryobehälter 615 in die Verkapselung 626 integriert (eingeschlossen). Dies kann durch Eingießen der Kryobehälter 615 in das Verkapselungsmaterial oder ein Aufkleben erfolgen. Die Kryobehälter 615 werden durch Hohlnadeln oder Kapillaren gebildet.

Die Beschickung eines Kryobehälters 615 erfolgt, indem an ein Ende ein Unterdruck angelegt und über das entgegengesetzte Einlassende 617 die Kryoprobe aufgenommen wird. Anstelle der Ausübung des Unterdrucks kann auch eine Probenaufnahme unter Wirkung von Kapillarkräften im Innern des Kryobehälters 615 vorgesehen sein. Insbesondere bei der Gestaltung gemäß Fig. 18 können in die einzelnen Kryobehälter 615 gleiche oder verschiedene Kryoproben 631, 632, ... aufgenommen werden. Die Kryobehälter 615 sind vorzugsweise derart voneinander beabstandet, dass die Einlassenden 617 entsprechend dem Format einer Mikro- oder Nanotiterplatte ausgerichtet sind.

Gemäß einer alternativen, in Fig. 19 illustrierten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Kryoelements 620 wird der Kryobehälter 615 des Probenträgers 622 durch einen Schlauch gebildet, dessen Durchmesser in Längsrichtung des Schlauches veränderlich ist. Es wechseln sich Abschnitte 618 mit einem geringen Durchmesser und Teilkammern 619 ab, in denen der Schlauch erheblich verbreitert ist. Der Kryobehälter 615 umfasst eine Vielzahl von Teilkammern 619, die vorteilhafterwei-

se mit einer mechanischen Trenneinrichtung 400 vom Kryoelement 620 abgetrennt werden können. Der Kryobehälter ist auf der Verkapselung 626 des Probendatenspeichers 622 befestigt (z. B. aufgeklebt oder teilweise eingegossen). Die Beschickung des Kryobehälters 615 erfolgt unter Ausübung eines Unterdruckes derart, dass über das Einlassende 617 die suspendierte Kryoprobe in den Kryobehälter 615 eingesogen wird.

Gemäß Fig. 20 kann der Kryobehälter 615 auch aus einem Schlauch gebildet sein, der nur eine Teilkammer 619 aufweist, die wie dargestellt über einen Schlauchabschnitt 618 oder alternativ über mehrere Schlauchabschnitte beschickt oder entleert wird. Die Teilkammer 619 gemäß Fig. 20 ist beispielsweise aus einem Folienmaterial gebildet, dass auf die Verkapselung 626 aufgeklebt ist.

Im Gegensatz zu den aus der zellulären Biotechnologie bekannten Diagnosechips besteht beim Kryospeicherelement 620 zwischen der Probe 630 einerseits und dem Probendatenspeicher 622 und/oder den Steuer-, Sensor und/oder Anzeigeeinrichtungen 624 andererseits keine Verbindung, die auf eine Erfassung elektrischer Parameter der in der Probe eingefrorenen Zellen gerichtet ist.

In den Figuren 21 und 22 sind weitere Einzelheiten der Beschickung von und der Probenentnahme aus Kryoelementen 620 illustriert. Die Beschickung erfolgt gemäß Fig. 21 beispielsweise mit einer Ladeeinrichtung, die einerseits eine Vielzahl von Probenreservoirn 710 und andererseits eine Druckeinrichtung 720 aufweist. Das Kryospeicherelement 620 umfasst analog zu der in Fig. 17 gezeigten Ausführungsform einen rahmenförmigen Probenträger 621, an dem eine Vielzahl von Kryobehältern 615 in Form von Kapillaren oder Schläuchen angeordnet sind, deren

Einlassenden 617 in die Probenreservoirs 710 ragen. Die Probenreservoirs 710 sind beispielsweise Vorratsbehälter, in denen sich Proben nach der Gewinnung von einem Probanden befinden. Die Druckeinrichtung 720 umfasst einen Druckaufsatz 721, der druckdicht auf die entgegengesetzten Enden der Kryobehälter 615 aufsetzbar ist, und eine Anschlussleitung 722, über die alle Kryobehälter 615 mit einem Unterdruck beaufschlagbar sind. Die Enden der Kryobehälter 615 sind vorzugsweise zur gemeinsamen Aufnahme des Druckaufsatzes 721 eingerichtet an einem Rahmenteil angebracht. Sie können beispielsweise in der Oberfläche des Rahmens 627 münden. Unter der Wirkung des Unterdruckes werden Proben 630 in die Kryobehälter 615 gesogen.

Nach der Beschickung des Probenträgers 621 wird das Kryospeicherelement 620 von der Ladeeinrichtung getrennt. Die Einlassenden 617 werden ggf. bis zum Rahmen 627 gekürzt. Das Kryospeicherelement 620 wird auf ein Speichersubstrat 610 (siehe Fig. 14) aufgesetzt und mit diesem in eine Umgebung mit reduzierter Temperatur, z. B. ein Kryogefäß in einer Kryobank überführt.

In Fig. 22 ist eine Möglichkeit der Probenentnahme von einem Kryospeicherelement 620 mit einem mäanderförmig geführten Kryobehälter 615 illustriert. Die Teilproben 616 werden mit einer mechanischen Trenneinrichtung 400, z. B. einer Schneideinrichtung, abgetrennt. Dies kann vorteilhafterweise im Zustand reduzierter Temperatur erfolgen, so dass die übrige Probe unverändert bleibt.

In den Fig. 23 bis 26 sind Ausführungsformen erfindungsgemäß verwendeter Kryospeicherelemente 620 gezeigt, bei denen im Unterschied zu den oben beschriebenen Ausführungsformen der Probenträger 621 nicht in eine Verkapselung des Speicherschalt-

kreises, sondern in dessen Substratmaterial integriert ist. Fig. 23 zeigt beispielsweise einen Teil eines Kryospeicherelements 620 (ohne Verkapselung und ohne Kontaktfüße). Es ist ausschnittsweise ein Speicherschaltkreis 800 mit einem Substrat 810 und integrierten Bauelementen 820 dargestellt. Das Substrat ist beispielsweise ein Halbleiterwafer, wie er üblicherweise zur Herstellung integrierter Schaltkreise verwendet wird. Auf der Oberseite des Substrats 810 sind die Bauelemente 820 mit an sich bekannten Methoden der Halbleitertechnologie prozessiert. Auf der Unterseite des Substrats 810 sind als Probenaufnahmen kanalförmige Probenkammern 623 gebildet, die mit einer Deckschicht 830 verschlossen sind. Die Probenkammern 623 besitzen Ausmaße von beispielsweise 400 µm (Querschnittsdimension) und 20 mm (Länge). Die Probenkammern 623 können auch in einer strukturierten Substratschicht gebildet sein, die auf dem Substrat angeordnet ist (siehe Figur 24). Die Deckschicht 830 besteht aus einem Kunststoffmaterial, Glas oder einem Halbleitermaterial.

Es können auch mehrere Ebenen mit Probenkammern 623 vorgesehen sein, wie dies in Fig. 24 illustriert ist. Auf dem Substrat 810 kann eine erste strukturierte Substratschicht 811 mit Probenkammern 623 und einer ersten Deckschicht 830 vorgesehen sein. Auf der ersten Deckschicht 830 kann mindestens eine weitere strukturierte Substratschicht 812 mit Probenkammern 623 und einer weiteren Deckschicht 831 vorgesehen sein. Bei dieser Ausführungsform wird vorteilhafterweise ein vergrößertes Probenvolumen am zugehörigen Probendatenspeicher aufgenommen. Die Befüllung oder Probenaufnahme an den Kryospeicherelementen 620 gemäß den Figuren 23 und 24 erfolgt über Schlauchanschlüsse, die in die Verkapselung der Probendatenträger 622 integriert sind und nach der Verwendung abgeschnitten oder abgeklemmt werden.



In den Figuren 25 und 26 sind verschiedene Geometrien der kanalförmigen Probenaufnahmen 623 in den Substraten 810 schematisch illustriert. Es können beispielsweise mäanderförmige oder U-förmige Kanalformen mit verschiedenen Querschnittsdimensionen vorgesehen sein, die ggf. ineinander verschachtelt angeordnet sind.

Die in den Figuren 14 bis 26 dargestellten Ausführungsformen der Erfindung besitzt eine Reihe von Vorteilen. Das Kryospeicherelement wird durch einen elektronischen Chip gebildet, der als Probendatenspeicher einen elektronisch von außen beschreibbaren und lesbaren Speicher enthält. Eine temperaturabhängige Justage eines Lese-/Schreibkopfes etwa wie bei einem CD-Speicher ist nicht erforderlich. In dem Chip befindet sich mindestens eine Probenaufnahme entsprechend für eine oder mehrere Proben. Der Chip und/oder die Aufnahmefassung können mit einer elektronischen Schaltung zur Ansteuerung zusätzlicher Funktionselemente, Sensoren und/oder Alarmsystemen ausgestattet sein. Der in Figur 14 gezeigte Aufbau kann als dreidimensionales Mehrebenen-Kryosubstrat hergestellt werden, bei dem mehrere Leiterplatten 610 mit einer Vielzahl von Kryospeicherelementen übereinander gestapelt werden.

Die chipförmigen Speicherelemente können problemlos im gefrorenen Zustand von der Leiterplatte entnommen und auf andere Leiterplatten, Messeinrichtungen oder Bearbeitungsstationen übertragen werden, ohne dass die Probendaten verloren gehen. Die Kryospeicherelemente sind von außen elektronisch adressierbar.

Zusätzlich können zur Mehrfachabsicherung die Kryospeicherelemente mit einer oder mehreren Kennungen, automatisch lesbaren

oder visuell kontrollierbaren Farbmarkierungen versehen sein. Die Kryospeicherelemente gemäß Figur 15 lassen sich gegenüber den Dimensionen herkömmlicher integrierter Schaltkreise auch weiter miniaturisieren. Bei Miniaturisierung wird eine optische Ansteuerung anstelle der elektrischen Kontaktierung bevorzugt.

Die mindestens eine Leiterplatte eines Speichersubstrates kann mit einem Computer-Bus-System verbunden sein, mit dem eine individuelle Abfrage und Ansteuerung der einzelnen Kryospeicherelemente erfolgt. Die in Figur 15 dargestellte Form von Kryospeicherelementen kann anwendungsabhängig abgewandelt werden (z. B. runde oder mehreckige Probenträger).

Wichtige Merkmale der Erfindung werden im Folgenden zusammengefasst.

Erfindungsgemäße Speichersubstrate kombinieren eine Materialaufnahme mit einer probenspezifischen Datenaufnahme. Während der Tieftemperaturlagerung ist die selektive Entnahme von Material (Zellen, Zellsuspensionen) und das Lesen/Ablegen von Daten und/oder Datenmaterial möglich.

Die Datenidentifizierung wird mehrfach abgesichert, indem die Proben und die Probendatenspeicher an den gleichen oder unmittelbar aneinandergrenzenden Substratpositionen angeordnet sind. Zusätzlich kann das Speichersubstrat gefärbt sein, so dass allein aus der Färbung des Kryospeicherelements und des Grundkörpers festgestellt werden kann, aus welchem Speichersubstrat die jeweilige Probe stammt.

Die Kryospeicherelemente sind leicht desinfizierbar und wiederverwendbar. Sie bilden ferner einen Schutz für die Proben-

datenspeicher gegenüber den Umgebungsbedingungen bei der erfindungsgemäßen Kryokonservierung.

Es ist ferner möglich, die Grundkörper und Kryospeicherelemente eines Speichersubstrates einheitlich mit einem Farbton oder einem digitalen oder analogen Erkennungsmuster zu versehen, die jederzeit eine eindeutige Zuordnung beider Teile zulässt. Dies besitzt Vorteile für eine automatisierbare optische Kontrolle (z. B. Farb- und Codierungserfassung).

Auf dem erfindungsgemäßen Kryospeicher können erstmals Proben-  
daten in Kilobyte- bis Megabytebereich gespeichert werden. Dies ist insbesondere bei der Speicherung von Messergebnissen von Vorteil.

Während der Nutzungsdauer eines Speichersubstrates können jederzeit Daten ergänzt werden (Datenakkumulation). Auf diese Weise lassen sich alle an den Proben erworbenen Daten bzw. alle ausgeführten Manipulationen, Messungen, Behandlungen oder dergleichen lückenlos probenspezifisch dokumentieren.

Es können spezifische Behandlungen der Proben insbesondere in den Chip-förmigen Speicherelementen selektiv mit einer Prozedurprogrammierung und -speicherung durchgeführt werden. Beispielsweise kann im Rahmen einer Kryokonservierung ein bestimmtes Heiz-, Kühl-, Mess-, Kontroll- und Alarm-/Anzeigeprogramm abgearbeitet und im Progammdatenspeicher dokumentiert werden. Im gefrorenen Zustand können verschiedene Kryospeicherelemente verschiedene Temperatur- oder Messprogramme durchlaufen. Es kann z. B. lokal ein Auftauen ausgelöst werden, um eine Messung an der Probe durchzuführen. Die oben genannten Heizelemente können bei allen Ausführungsformen erfindungsgemäßer Speichersubstrate für eine lokale Erwärmung

von Speichermedien verwendet werden. Auf die Speichermedien kann bei lokaler Erwärmung zugegriffen werden, während die zugehörige Probe im kryokonservierten Zustand verbleibt.

Es kann erfindungsgemäß vorgesehen sein, dass das Speichersubstrat mit einer rein elektronischen Datenbank kombiniert betrieben wird, in der die Probandaten des Speichersubstrates gespiegelt abgelegt sind.

Die Abdeckung der Probenaufnahmen kann teilweise oder vollständig transparent sein. Durch diese Schicht werden optische und andere Messverfahren in die Probenaufnahme eingekoppelt. Beispielsweise können die Proben bildhaft dargestellt werden. Es sind Fluoreszenzmessungen, dielektrische Messungen und/oder Ultraschalldarstellungen möglich.

Eine erfindungsgemäße Kryodatenbank umfasst eine Vielzahl der erläuterten Speichersubstrate, eine Steuereinrichtung und eine Bearbeitungseinrichtung zur Manipulierung der Speichersubstrate und zur Entnahme von Proben.

Die in der vorstehenden Beschreibung, den Ansprüchen und den Zeichnungen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausgestaltungen von Bedeutung sein.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Kryokonservierung, bei dem auf einem Speichersubstrat eine Vielzahl von Proben angeordnet und positionsspezifisch Probendaten, die für Merkmale von jeweils einer Probe charakteristisch sind, gespeichert werden.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem die Probendaten auf dem Speichersubstrat an, neben oder unter der zugehörigen Probe gespeichert werden.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, bei dem als Probendaten Informationen zur Identifizierung der Proben, Informationen über Substanzmerkmale der Proben, Messergebnisse und/oder Behandlungsschritte gespeichert werden.
4. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Probendaten im gekühlten Zustand des Speichersubstrates gelesen und/oder geschrieben werden.
5. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem jeweils eine Probe auf einem Probenträger angeordnet und die zugehörigen Probendaten in einem Probendatenspeicher gespeichert werden, wobei jeweils ein Probenträger und ein Probendatenspeicher ein Verbundbauteil bilden, das zur Probenentnahme vom Speichersubstrat lösbar ist.
6. Verfahren gemäß Anspruch 5, bei dem eine Probe vom Substratspeicher in Verbindung mit den gespeicherten Probendaten entnommen und auf ein anderes Substrat oder zu einer Meß- oder Behandlungseinrichtung überführt wird.

7. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Probendaten optisch, magnetisch, topographisch oder elektromagnetisch gespeichert werden.
8. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Proben Suspensionen von mindestens einer Zelle, Zellbestandteilen, Zellaggregaten und/oder Gewebe umfassen.
9. Verfahren gemäß Anspruch 8, bei dem die Proben zusätzlich Referenz- und Sondenproben umfasst.
10. Verfahren gemäß einem der vorgehenden Ansprüche, bei dem an einer gefrorenen, erwärmten oder aufgetauten Probe im gekühlten Zustand des übrigen Speichersubstrats eine Messung und/oder eine Behandlung erfolgt und die Messergebnisse als Probendaten gespeichert werden.
11. Verfahren gemäß einem der vorgehenden Ansprüche, bei dem eine Steuerung des Zustandes mindestens einer Probe auf dem Speichersubstrat mit einem der Probe zugeordneten Rechnerschaltkreis erfolgt.
12. Speichersubstrat zur Kryokonservierung einer Vielzahl von Proben, das eine Vielzahl von Kryospeicherelementen enthält, die jeweils durch ein Verbundbauteil aus einem Probenträger und einem Probendatenspeicher gebildet werden.
13. Speichersubstrat gemäß Anspruch 12, bei dem jedes Kryospeicherelement lösbar in einem Grundkörper des Speichersubstrates angeordnet ist.

14. Speichersubstrat gemäß einem der Ansprüche 12 oder 13, bei dem als Kryospeicherelement ein Formteil vorgesehen ist, das den Probenträger und den Probendatenspeicher umfasst.
15. Speichersubstrat gemäß einem der Ansprüche 12 oder 13, bei dem als Kryospeicherelement ein integrierter Schaltkreis mit einem Speicher vorgesehen ist, der mit mindestens einem Probenträger zur Aufnahme jeweils einer Probe ausgestattet ist.
16. Speichersubstrat gemäß Anspruch 15, bei dem der Probenträger in den Aufbau des integrierten Schaltkreises integriert ist.
17. Speichersubstrat gemäß Anspruch 16, bei dem der Probenträger einen Kryobehälter aufweist.
18. Speichersubstrat gemäß Anspruch 16, bei dem der Probenträger mindestens eine schlauch-, kapillar- oder kanalförmige Probenkammer aufweist.
19. Speichersubstrat gemäß Anspruch 16, bei dem der Probenträger als kanalförmige Probenaufnahme in einem Substrat des integrierten Schaltkreises vorgesehen ist.
20. Speichersubstrat gemäß Anspruch 16, bei dem das Kryospeicherelement einen Rechnerschaltkreis enthält, mit dem die Funktion des Kryospeicherelements verwaltet wird und über den das Kryospeicherelement nach außen kommuniziert.
21. Kryospeicherelement, das einen Probenträger für eine Probe und einen Datenspeicher zur Speicherung von Probendaten umfasst.

22. Verfahren zum Betrieb einer Kryobank, bei dem die Proben mit einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 kryokonserviert und/oder behandelt werden.



1/17

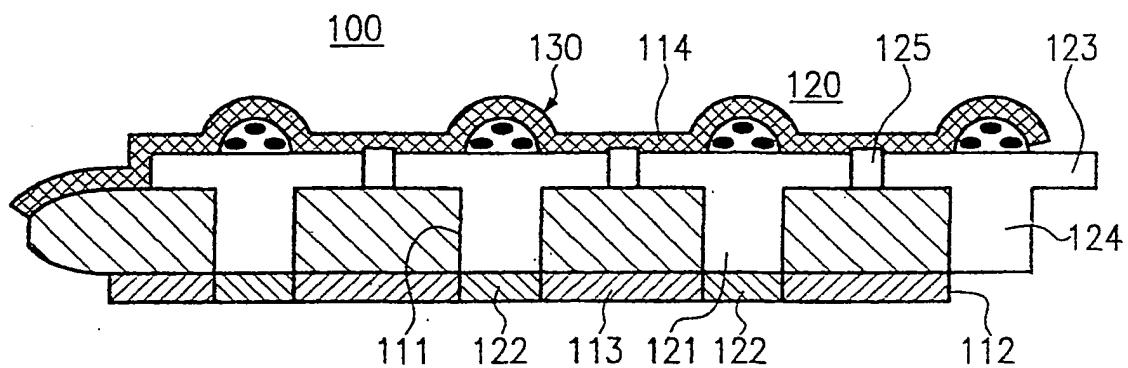


FIG.1

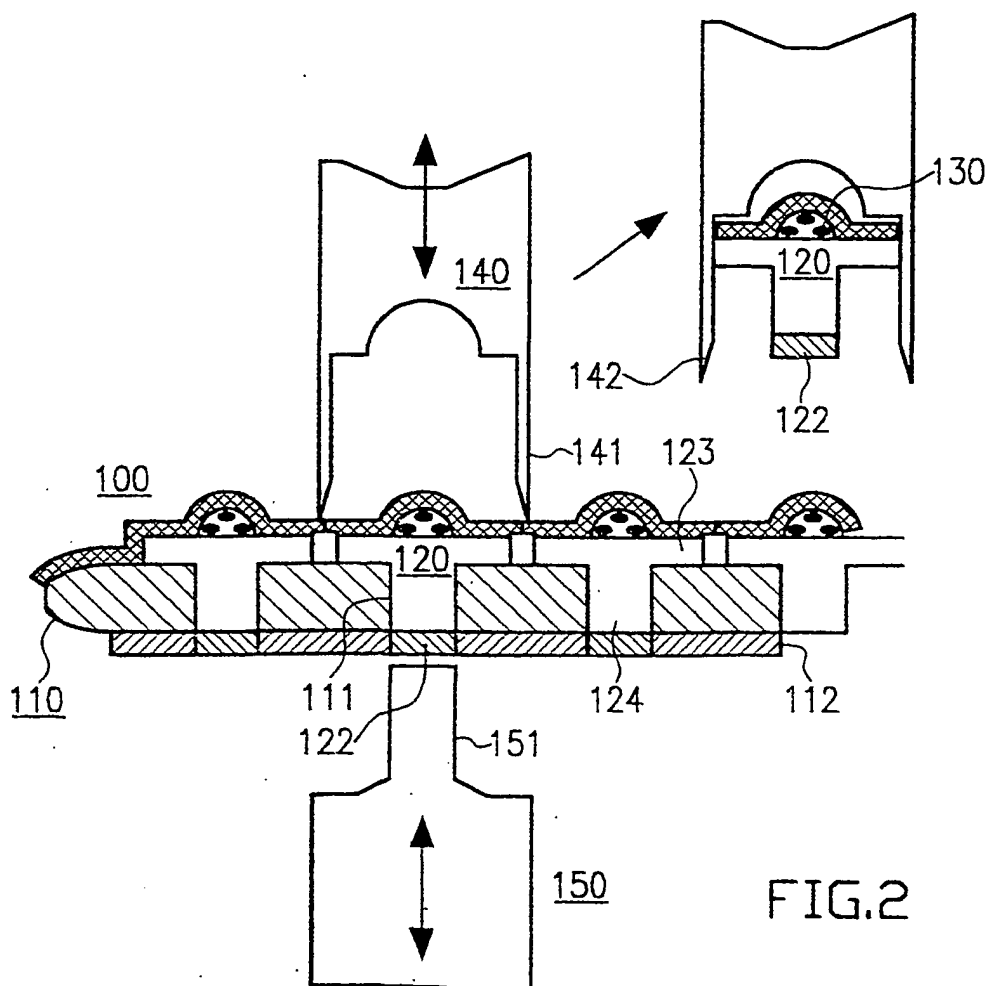


FIG.2

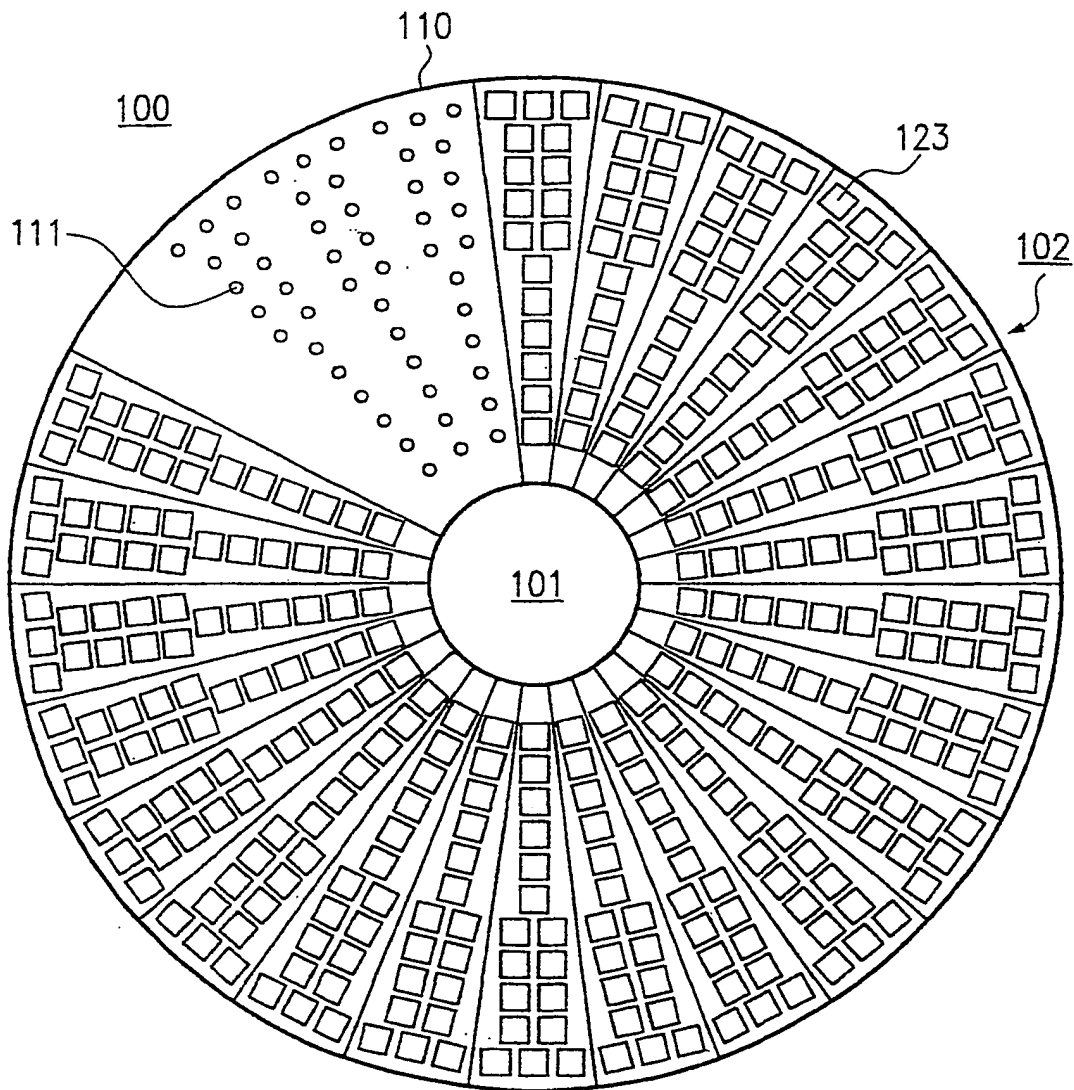
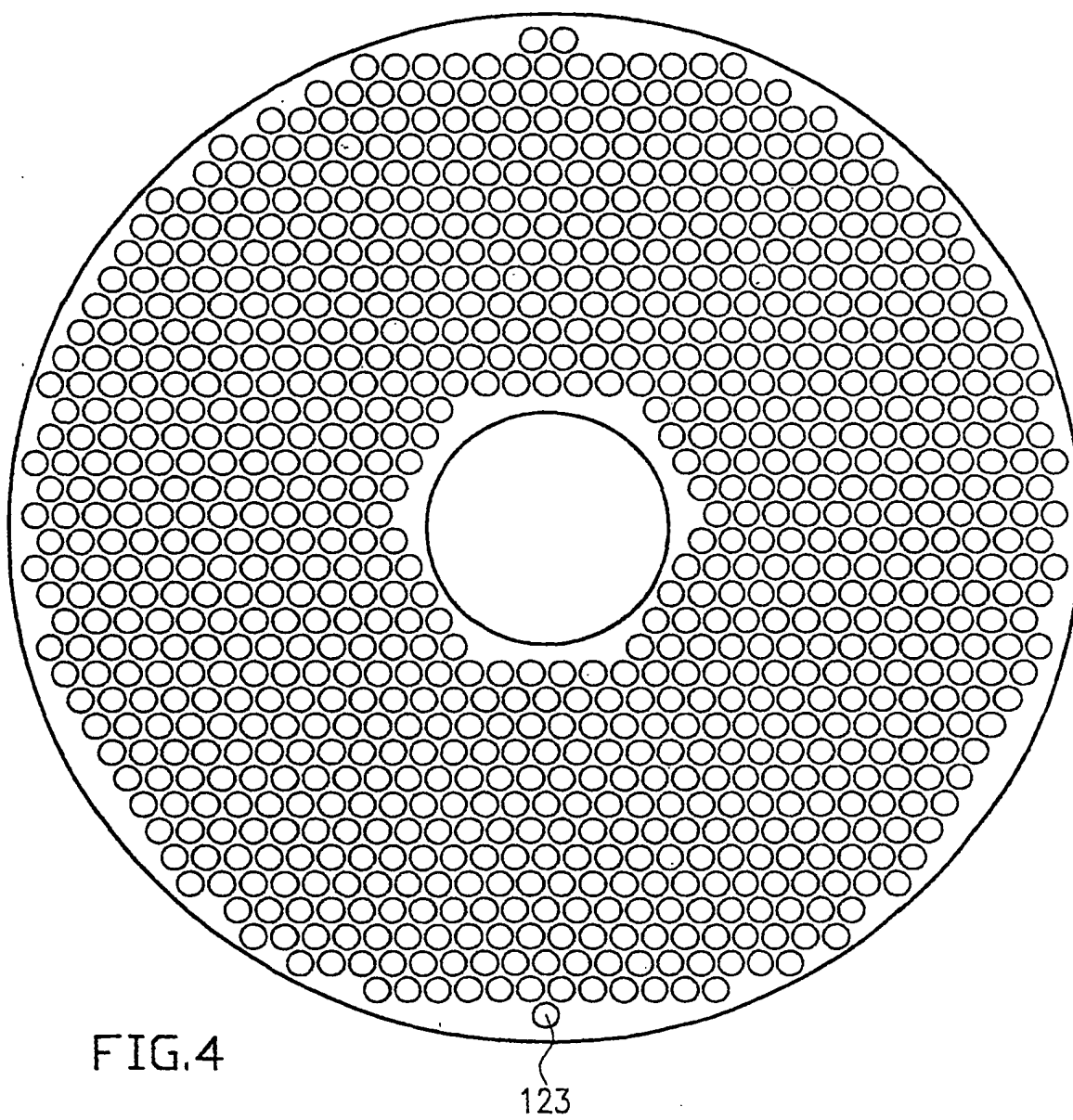


FIG.3



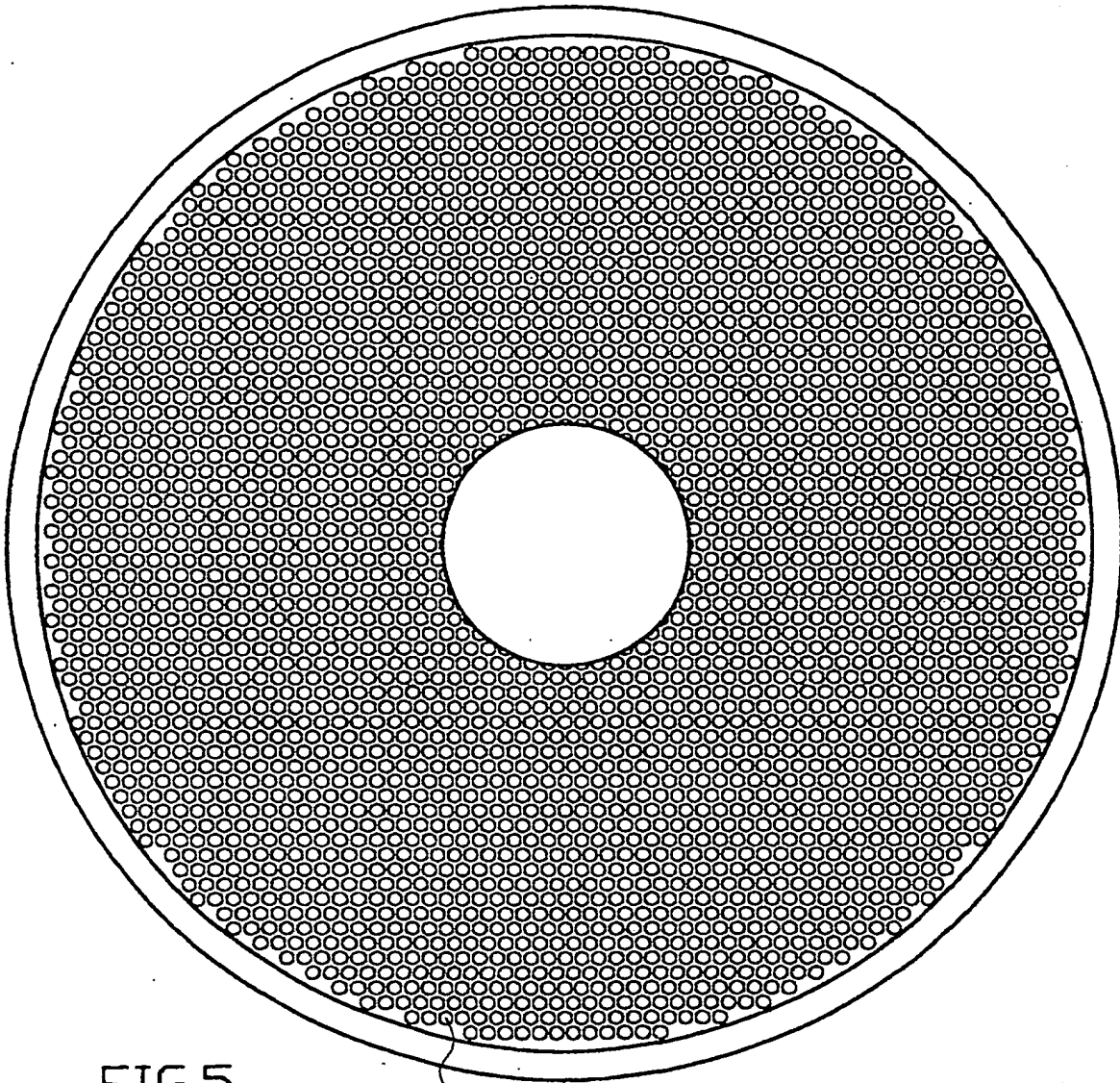
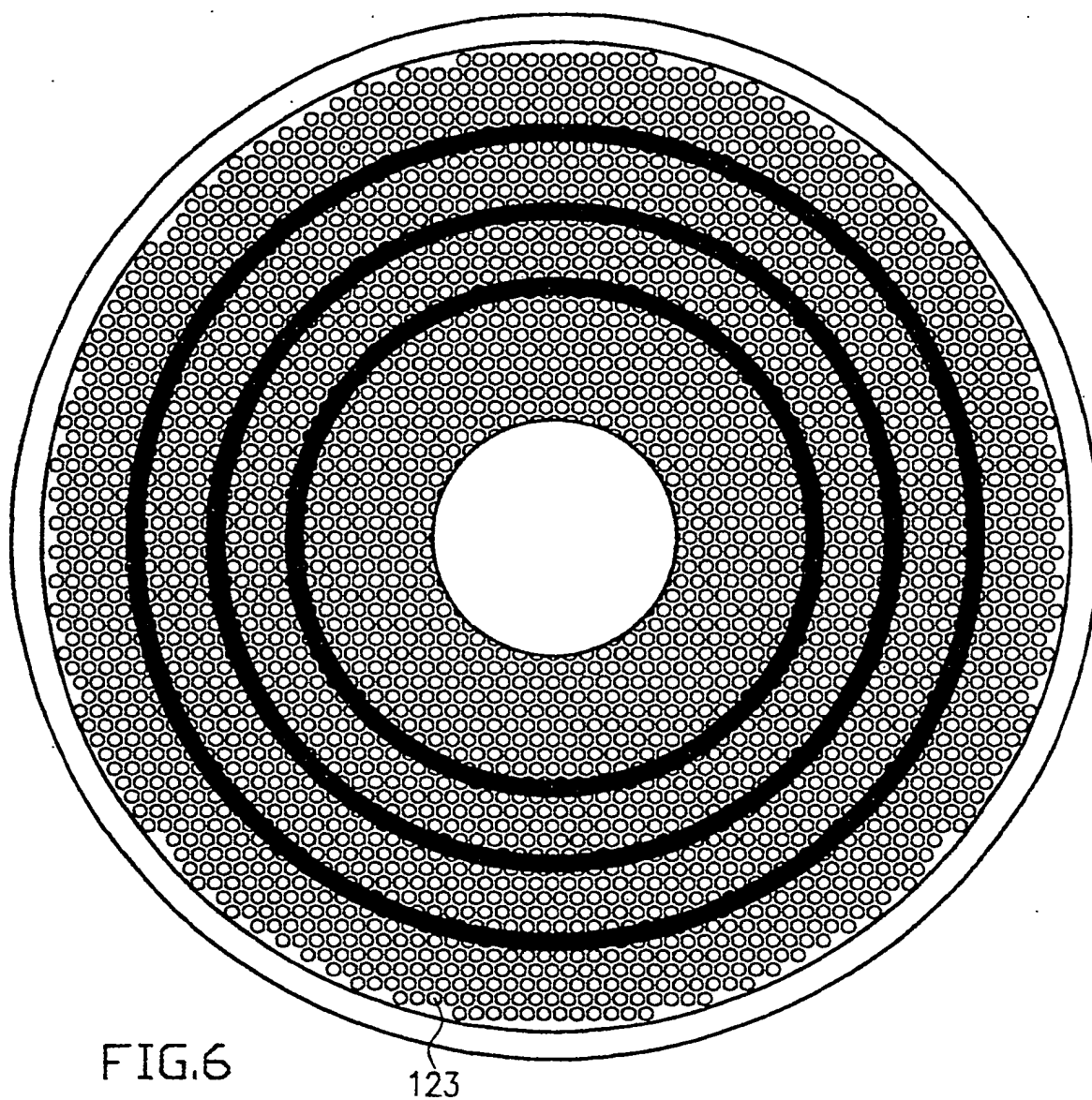


FIG.5

123



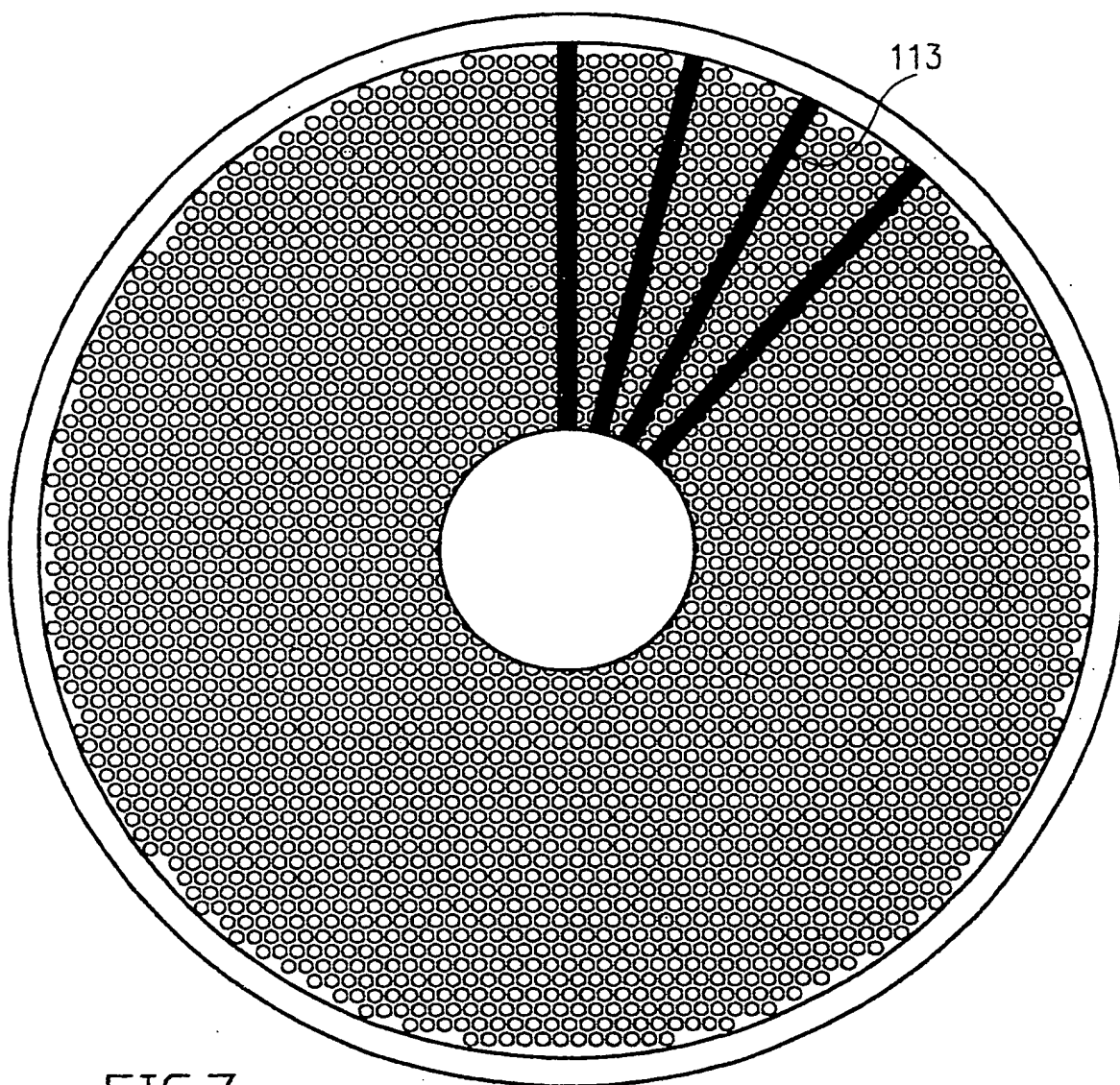


FIG. 7

7/17

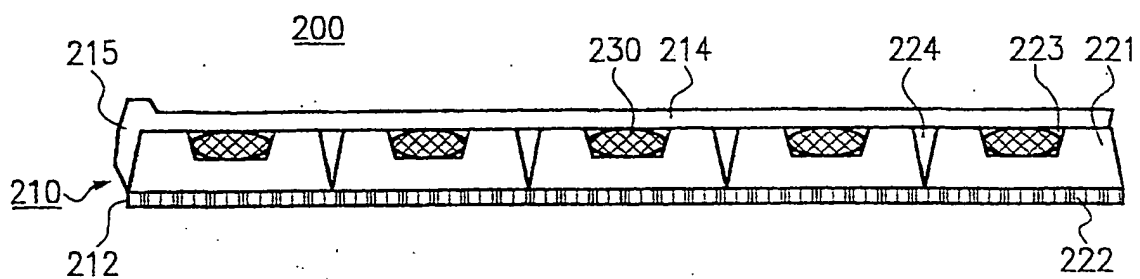


FIG. 8

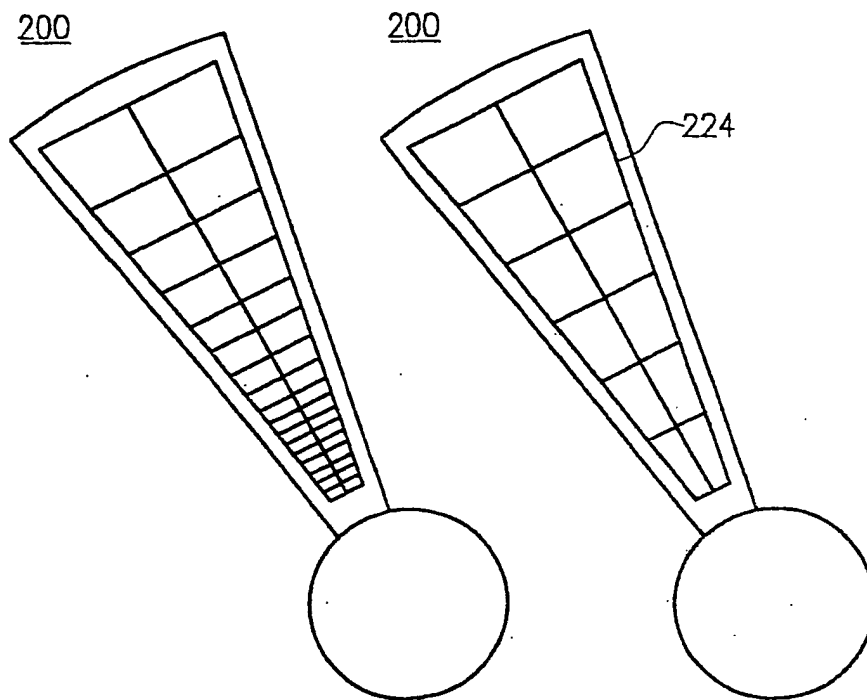


FIG. 9

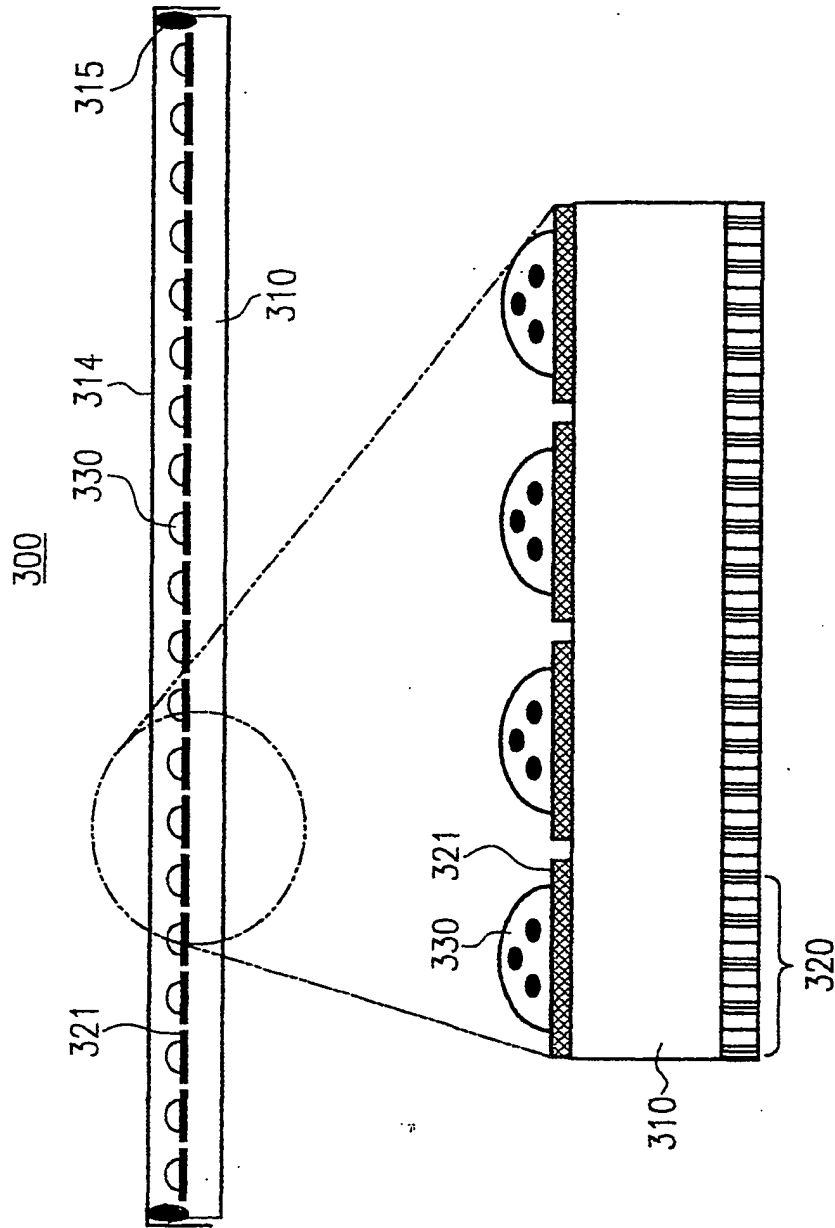
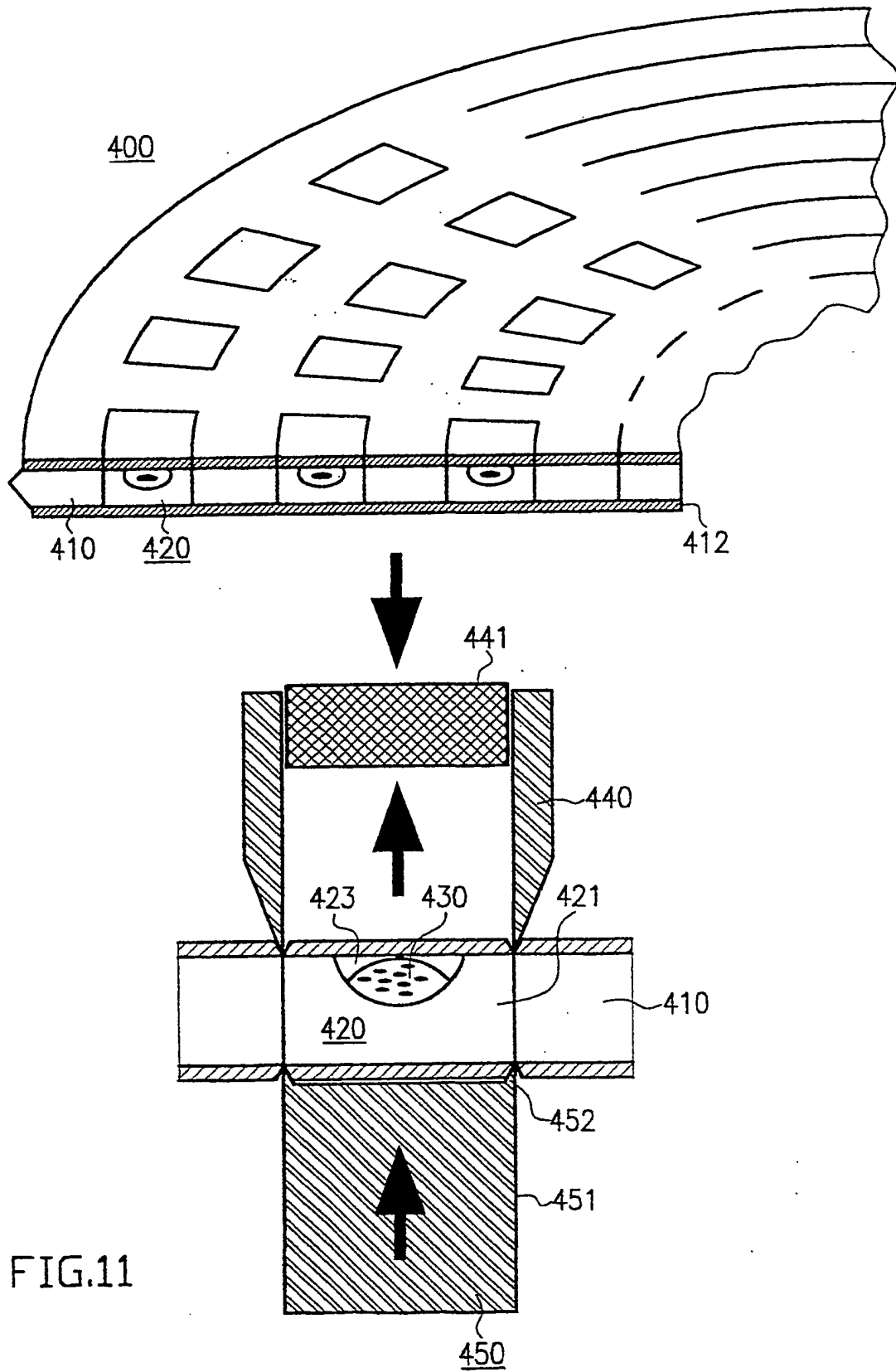


FIG. 10



9/17



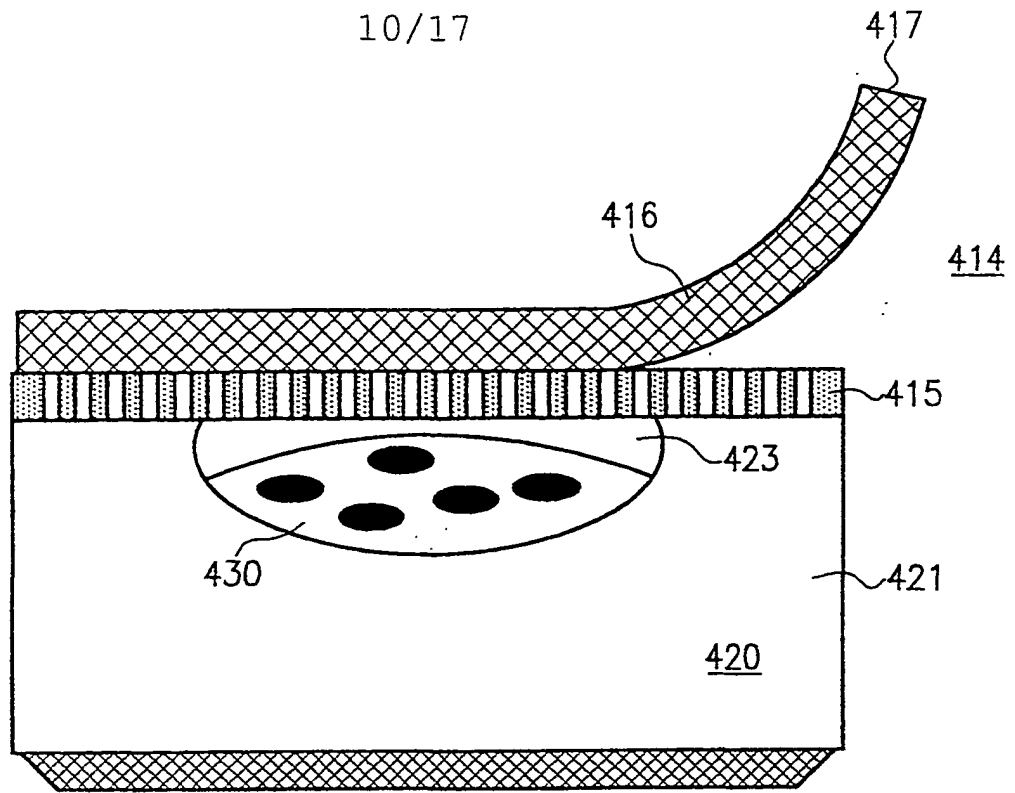


FIG.12

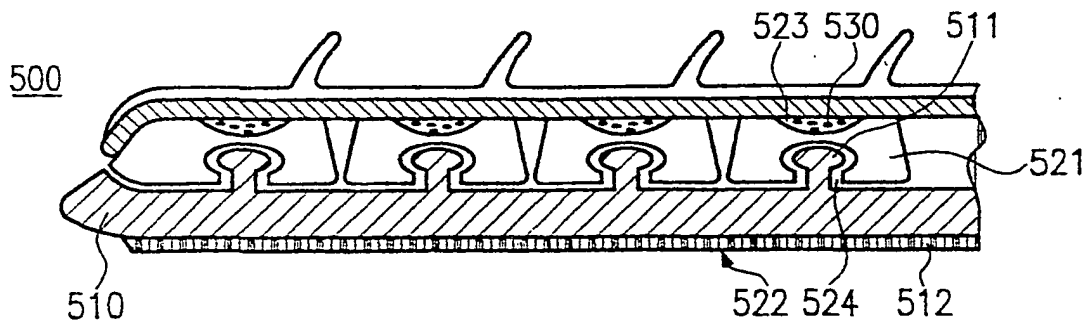


FIG.13

11/17

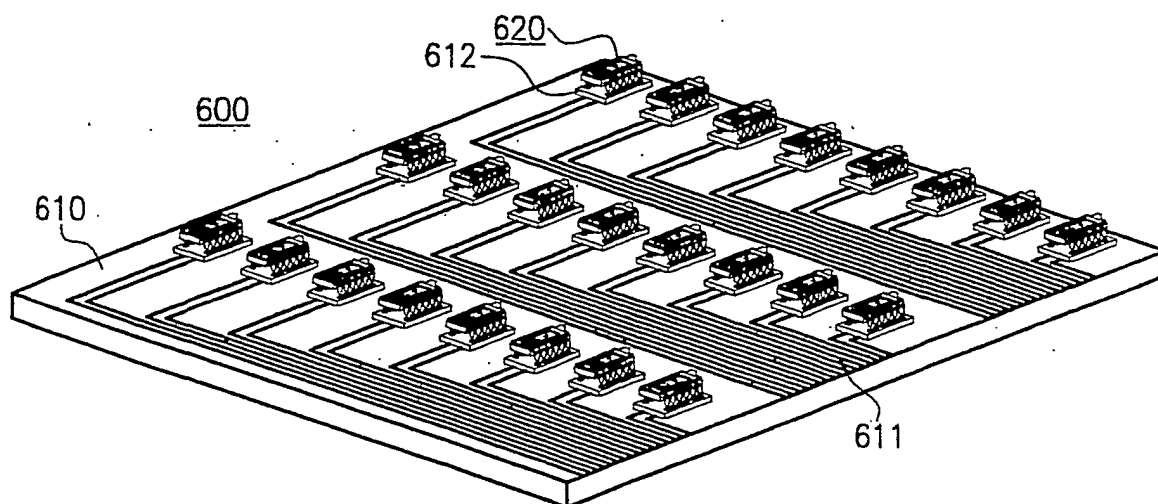
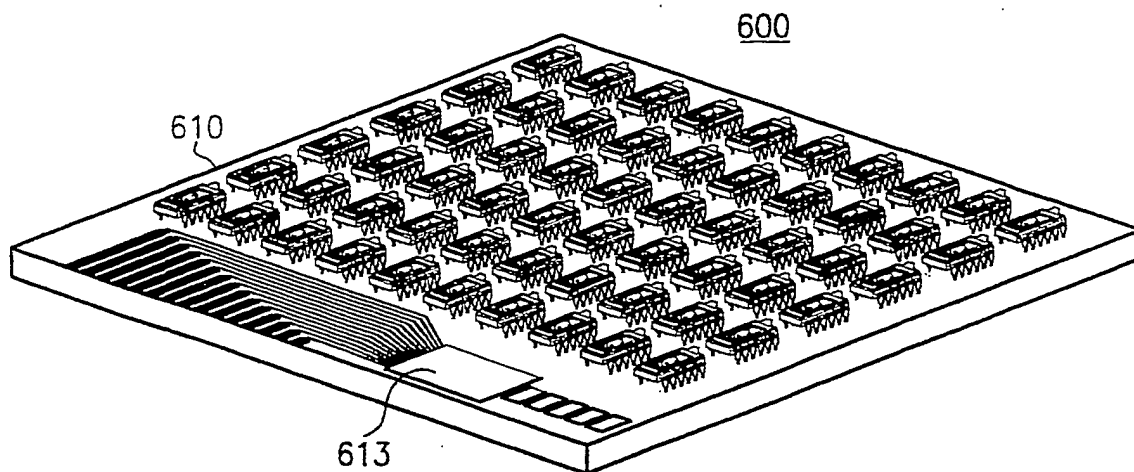
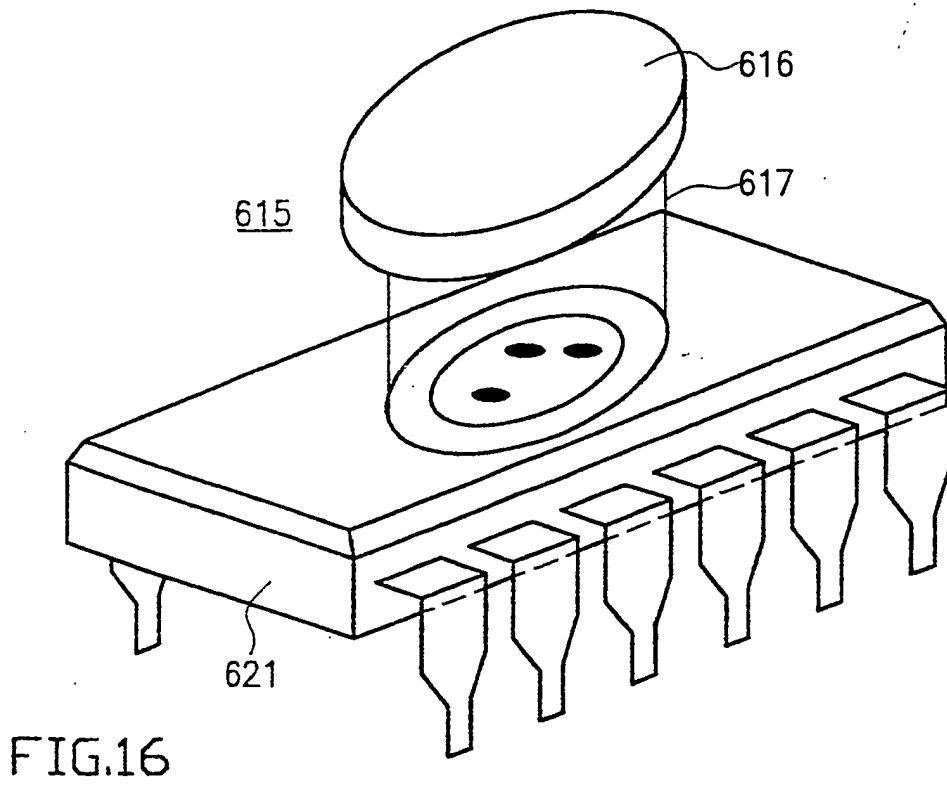
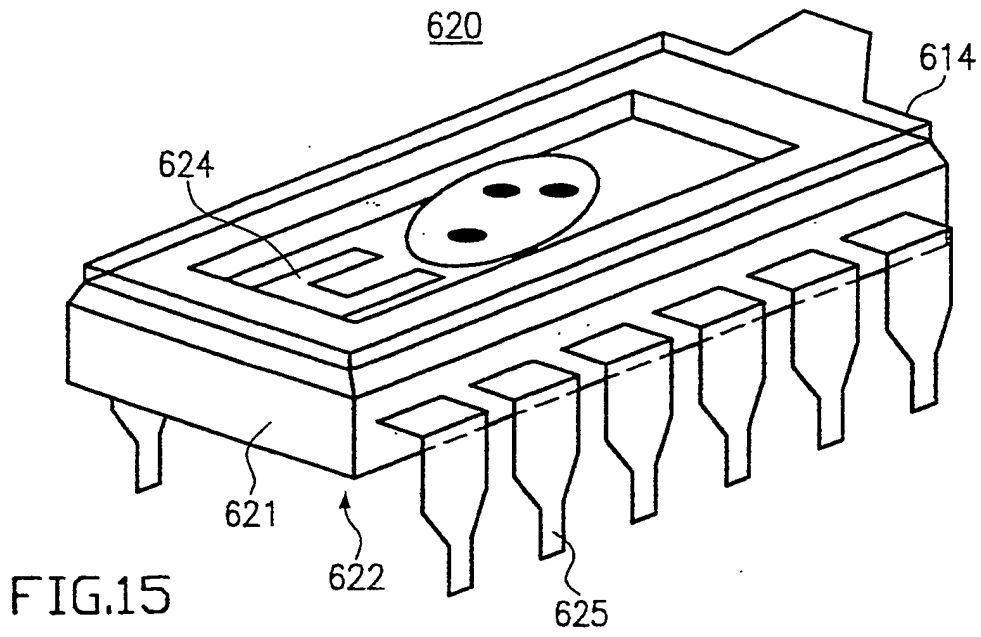


FIG.14





13/17

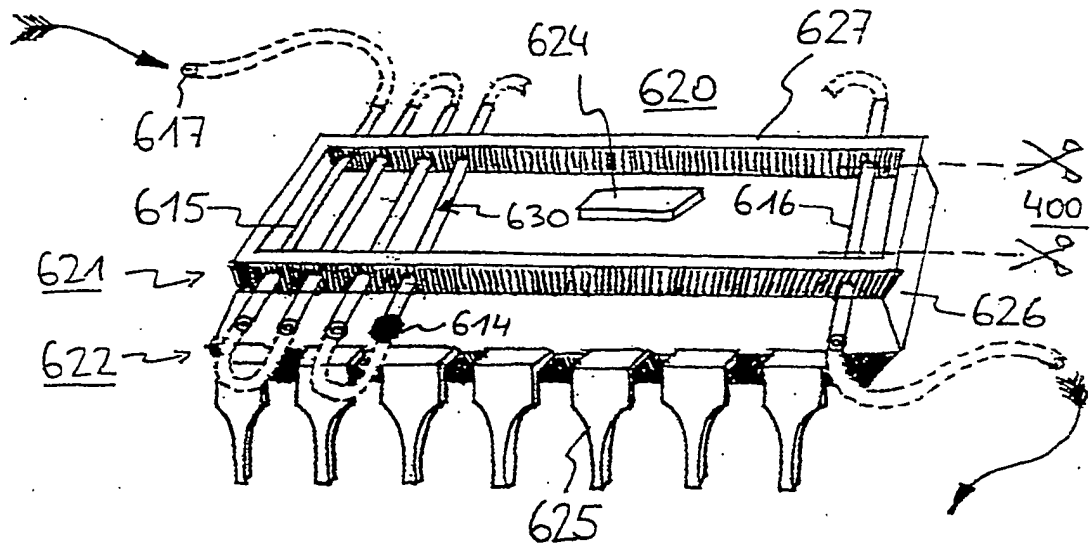


FIG. 17

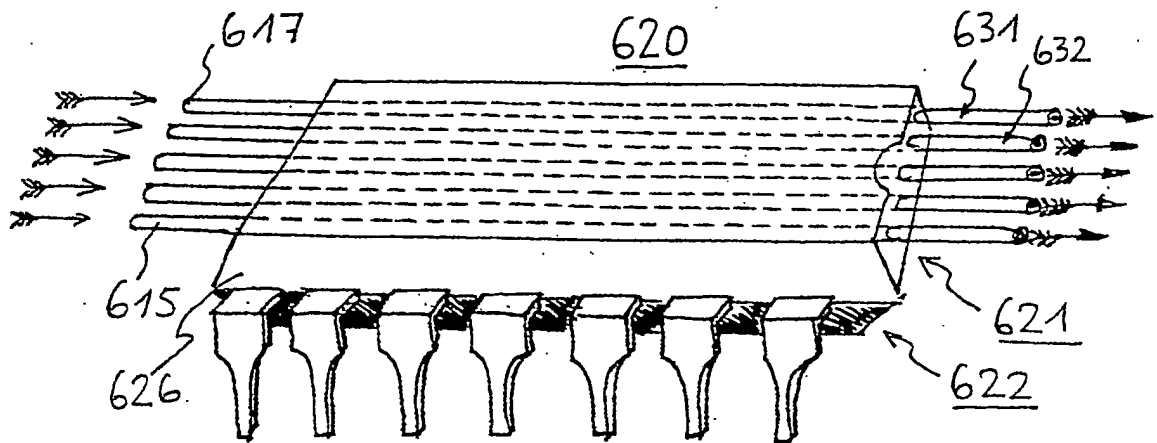
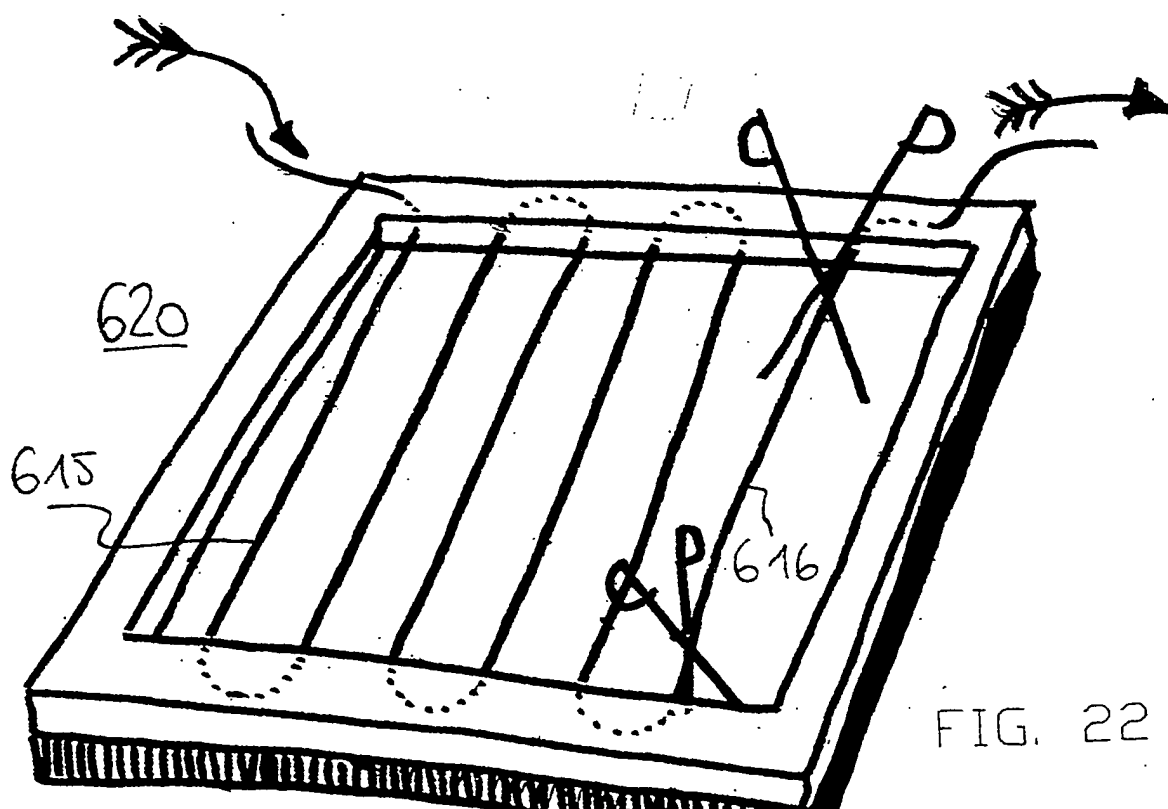
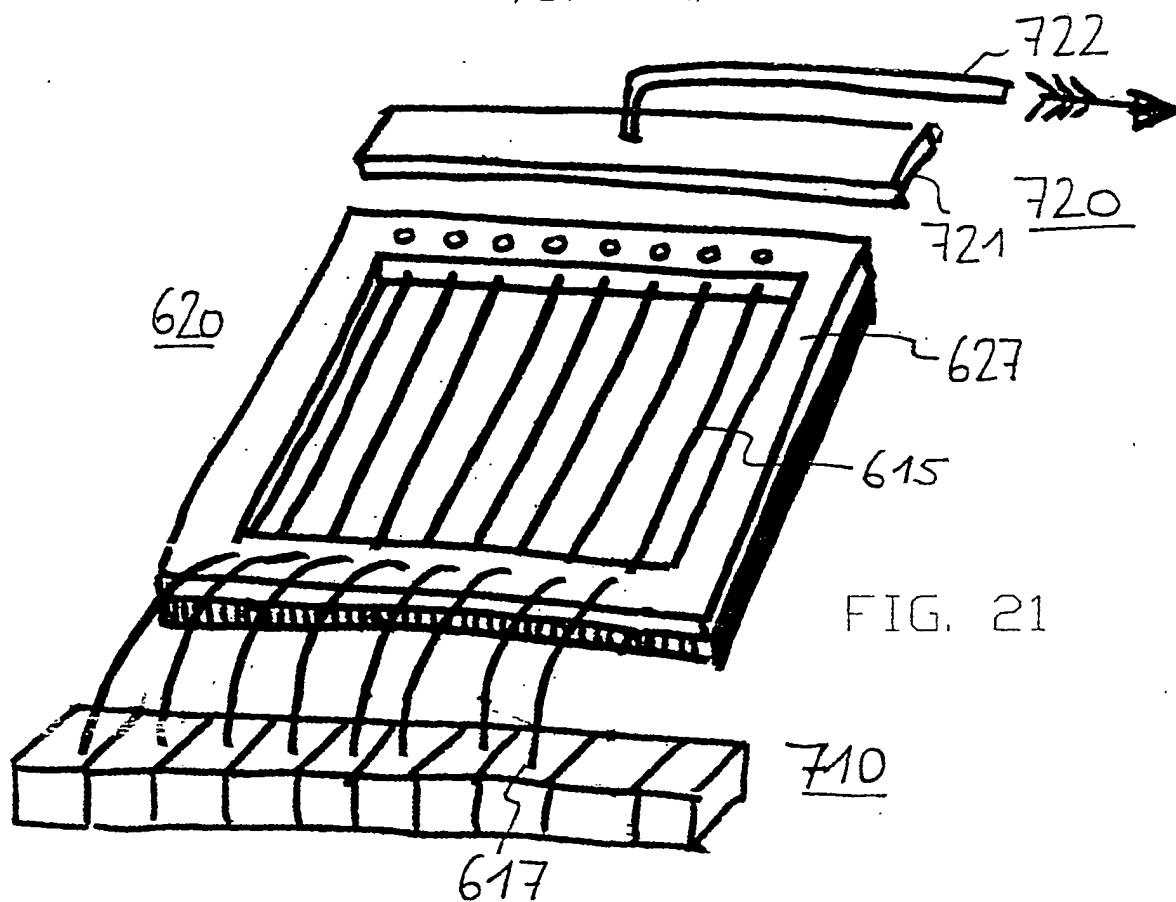
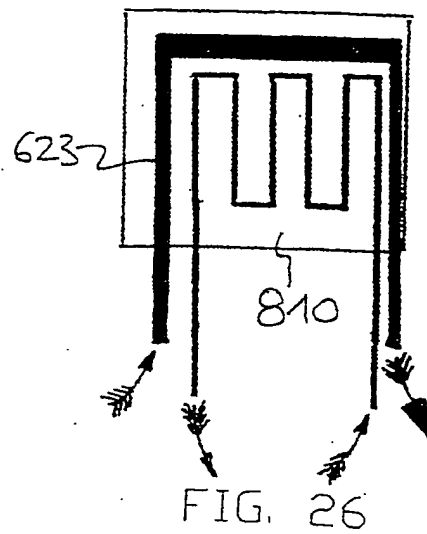
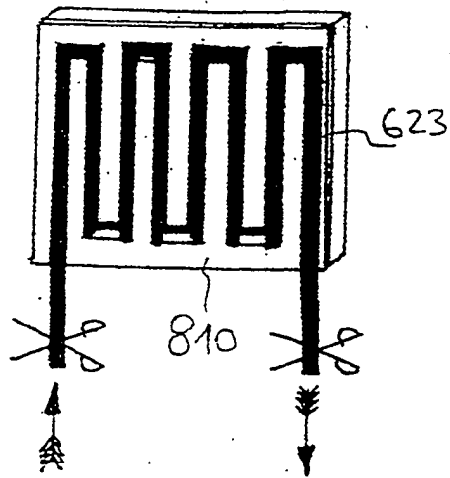
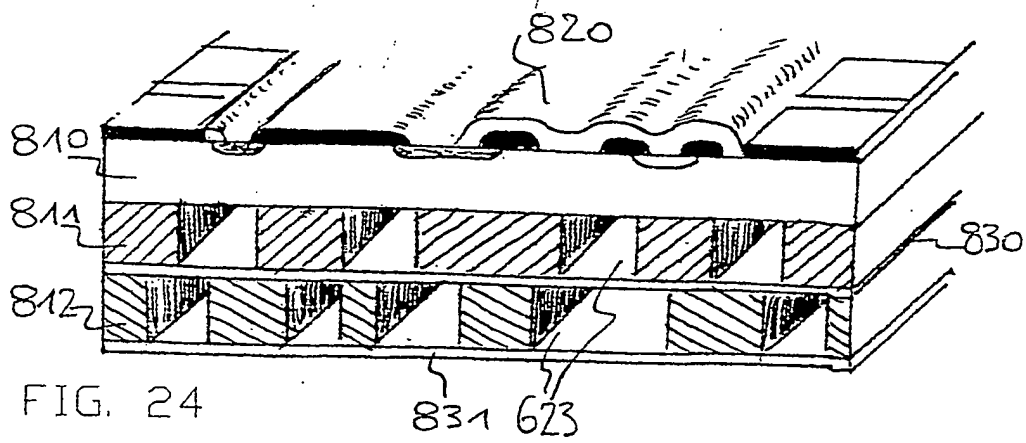
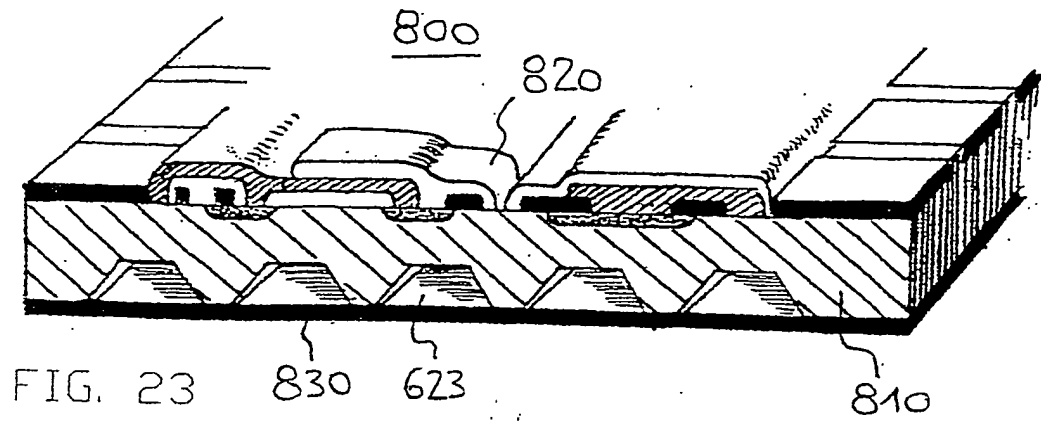


FIG. 18



15/17







17/17

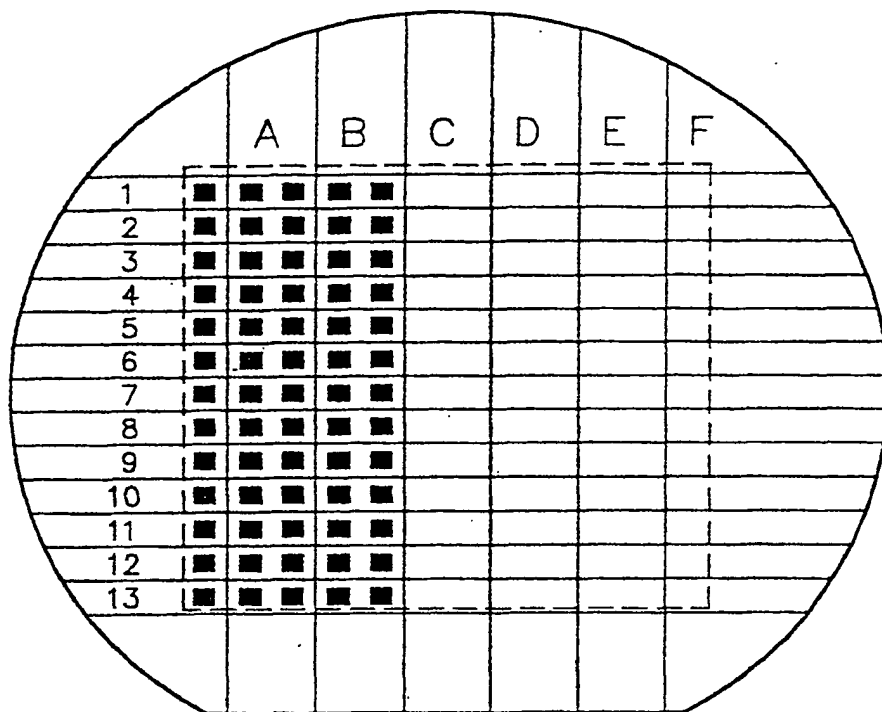


FIG. 27  
Stand der Technik

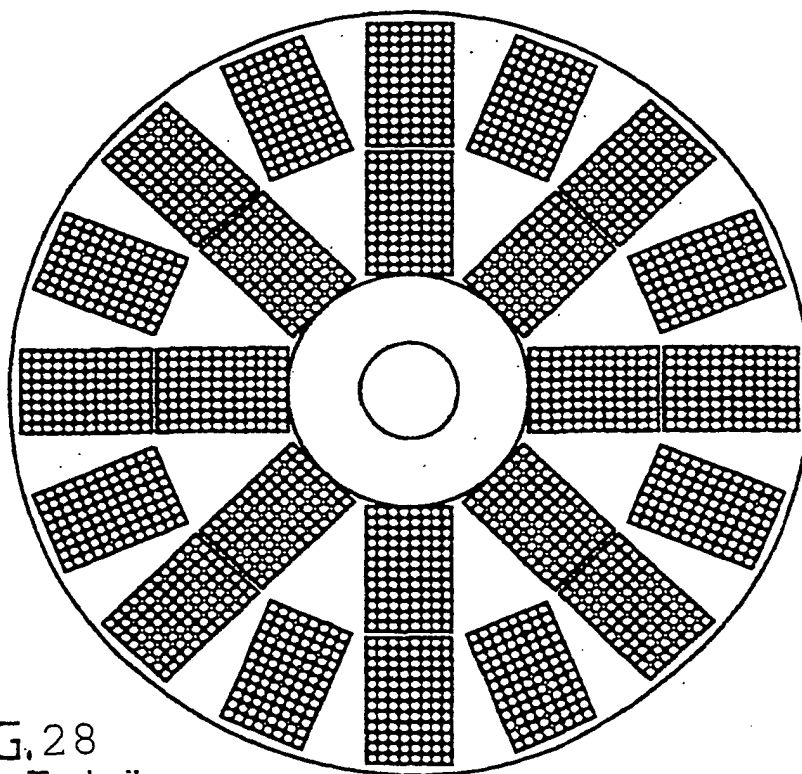


FIG. 28  
Stand der Technik

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
13. Juni 2002 (13.06.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/046719 A3

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: G01N 1/42,  
B01L 7/00, A01N 1/02

(DE) ZIMMERMANN, Heiko [DE/DE]; Untere Kaiser-  
str. 42, 66386 St. Ingbert (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/14400

(74) Anwalt: HERTZ, Oliver; v. Bezold & Sozien,  
Akademiestrasse 7, 80799 München (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:  
7. Dezember 2001 (07.12.2001)

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,  
ZA, ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 60 889.2 7. Dezember 2000 (07.12.2000) DE  
101 44 925.9 12. September 2001 (12.09.2001) DE

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Aus-  
nahme von US*): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT  
ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN  
FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstraße 54, 80636  
München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): FUHR, Günter  
[DE/DE]; Kavalierstrasse 15, 13187 Berlin (DE). HAGE-  
DORN, Rolf [DE/DE]; Wartiner Str. 16, 13057 Berlin

Veröffentlicht:

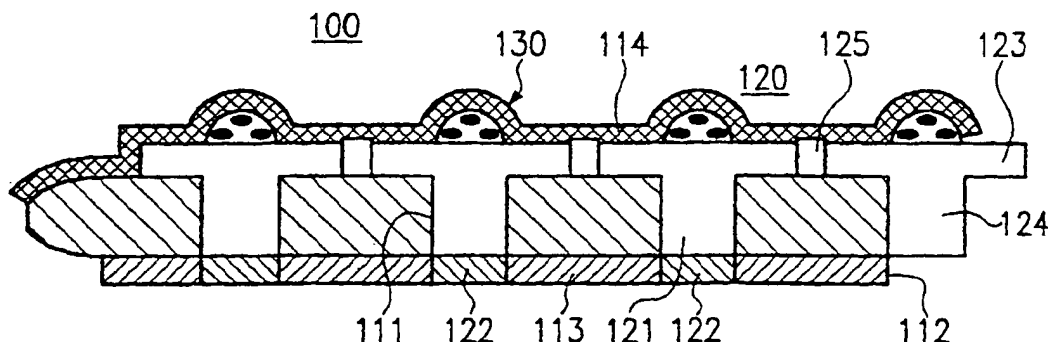
— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts: 19. Dezember 2002

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: CRYOSTORAGE METHOD AND DEVICE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR KRYOSPEICHERUNG



(57) Abstract: The invention relates to a cryopreservation method, according to which at least one sample is placed on a storage substrate, and position-specific sample data that characterizes attributes of the sample is stored. The invention also relates to a storage substrate for use in cryopreservation involving a method of the aforementioned type.

(57) Zusammenfassung: Bei einem Verfahren zur Kryokonservierung werden auf einem Speichersubstrat mindestens eine Probe angeordnet und positionsspezifisch Probandaten, die für Merkmale der Probe charakteristisch sind, gespeichert. Es wird auch ein Speichersubstrat zur Kryokonservierung mit einem derartigen Verfahren beschrieben.

WO 02/046719 A3

BNSDOCID: <WO\_\_0246719A3\_I\_>

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 01/14400

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 G01N1/42 B01L7/00 A01N1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 A01N G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 199 21 236 A (EVOTEC BIOSYSTEMS AG) 30 November 2000 (2000-11-30) cited in the application column 1, line 1 - line 59 column 4, line 15 - line 40 column 5, line 8 - line 30 column 9, line 34 - line 39 figures 6,7 ---	1-14, 21, 22
X	US 5 925 511 A (HAGEDORN ROLF ET AL) 20 July 1999 (1999-07-20)  column 2, line 63 - column 3, line 4 column 4, line 42 - column 5, line 18 column 5, line 50 - line 63; claim 1 & EP 0 804 073 A (FRAUNHOFER GESELLSCHAFT) 5 November 1997 (1997-11-05) cited in the application ---	1-4, 7-10, 12, 14, 21, 22
A	---	15-20
	--- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 June 2002

Date of mailing of the international search report

09/07/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Muellners, W

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In ☐ International Application No

PCT/EP 01/14400

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 197 52 085 A (EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH) 25 June 1998 (1998-06-25) cited in the application column 1, line 26 - line 61 column 5, line 65 -column 6, line 6 ----	1-22
A	EP 0 706 825 A (GRIEB REINHARD) 17 April 1996 (1996-04-17) the whole document ----	1-22
A	DE 196 21 179 A (NONNENMACHER KLAUS) 27 November 1997 (1997-11-27) the whole document ----	1-22
A	DE 198 38 232 A (KNOELL HANS FORSCHUNG EV) 2 March 2000 (2000-03-02) the whole document -----	1-22

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International Application No  
PCT/EP 01/14400

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19921236	A	30-11-2000	DE 19921236 A1	30-11-2000
			WO 0068663 A1	16-11-2000
			EP 1177422 A1	06-02-2002
US 5925511	A	20-07-1999	DE 4438232 A1	02-05-1996
			AT 175306 T	15-01-1999
			WO 9613159 A1	09-05-1996
			DE 59504763 D1	18-02-1999
			EP 0804073 A1	05-11-1997
			JP 10509434 T	14-09-1998
DE 19752085	A	25-06-1998	DE 19752085 A1	25-06-1998
EP 0706825	A	17-04-1996	DE 9416270 U1	08-12-1994
			EP 0706825 A1	17-04-1996
			JP 8211065 A	20-08-1996
DE 19621179	A	27-11-1997	DE 19621179 A1	27-11-1997
DE 19838232	A	02-03-2000	DE 19838232 A1	02-03-2000

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/14400

## A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N1/42 B01L7/00 A01N1/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A01N G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, EPO-Internat

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 199 21 236 A (EVOTEC BIOSYSTEMS AG) 30. November 2000 (2000-11-30) in der Anmeldung erwähnt Spalte 1, Zeile 1 - Zeile 59 Spalte 4, Zeile 15 - Zeile 40 Spalte 5, Zeile 8 - Zeile 30 Spalte 9, Zeile 34 - Zeile 39 Abbildungen 6,7	1-14, 21, 22
X	US 5 925 511 A (HAGEDORN ROLF ET AL) 20. Juli 1999 (1999-07-20)	1-4, 7-10, 12, 14, 21, 22
A	Spalte 2, Zeile 63 - Spalte 3, Zeile 4 Spalte 4, Zeile 42 - Spalte 5, Zeile 18 Spalte 5, Zeile 50 - Zeile 63; Anspruch 1 & EP 0 804 073 A (FRAUNHOFER GESELLSCHAFT) 5. November 1997 (1997-11-05) in der Anmeldung erwähnt ----- -/-	15-20

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

27. Juni 2002

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

09/07/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Muellners, W

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. ....tionales Aktenzeichen

PCT/EP 01/14400

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
A	DE 197 52 085 A (EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH) 25. Juni 1998 (1998-06-25) in der Anmeldung erwähnt Spalte 1, Zeile 26 - Zeile 61 Spalte 5, Zeile 65 -Spalte 6, Zeile 6 -----	1-22
A	EP 0 706 825 A (GRIEB REINHARD) 17. April 1996 (1996-04-17) das ganze Dokument -----	1-22
A	DE 196 21 179 A (NONNENMACHER KLAUS) 27. November 1997 (1997-11-27) das ganze Dokument -----	1-22
A	DE 198 38 232 A (KNOELL HANS FORSCHUNG EV) 2. März 2000 (2000-03-02) das ganze Dokument -----	1-22



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

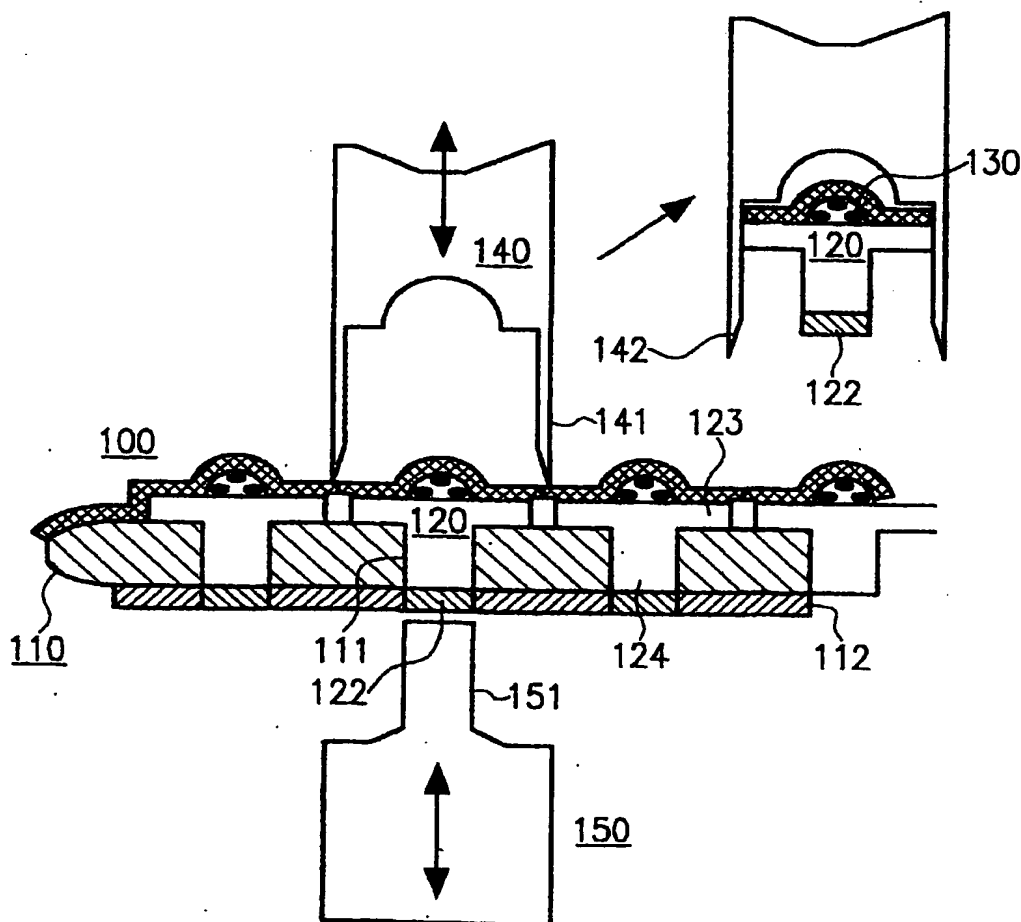
Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/14400

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument			Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung	
DE 19921236	A	30-11-2000	DE	19921236 A1			30-11-2000	
			WO	0068663 A1			16-11-2000	
			EP	1177422 A1			06-02-2002	
US 5925511	A	20-07-1999	DE	4438232 A1			02-05-1996	
			AT	175306 T			15-01-1999	
			WO	9613159 A1			09-05-1996	
			DE	59504763 D1			18-02-1999	
			EP	0804073 A1			05-11-1997	
			JP	10509434 T			14-09-1998	
DE 19752085	A	25-06-1998	DE	19752085 A1			25-06-1998	
EP 0706825	A	17-04-1996	DE	9416270 U1			08-12-1994	
			EP	0706825 A1			17-04-1996	
			JP	8211065 A			20-08-1996	
DE 19621179	A	27-11-1997	DE	19621179 A1			27-11-1997	
DE 19838232	A	02-03-2000	DE	19838232 A1			02-03-2000	

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie), Juli 1992)



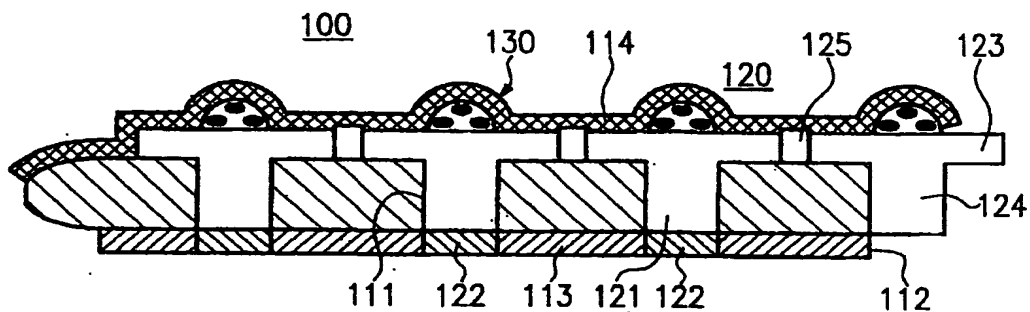


FIG.1

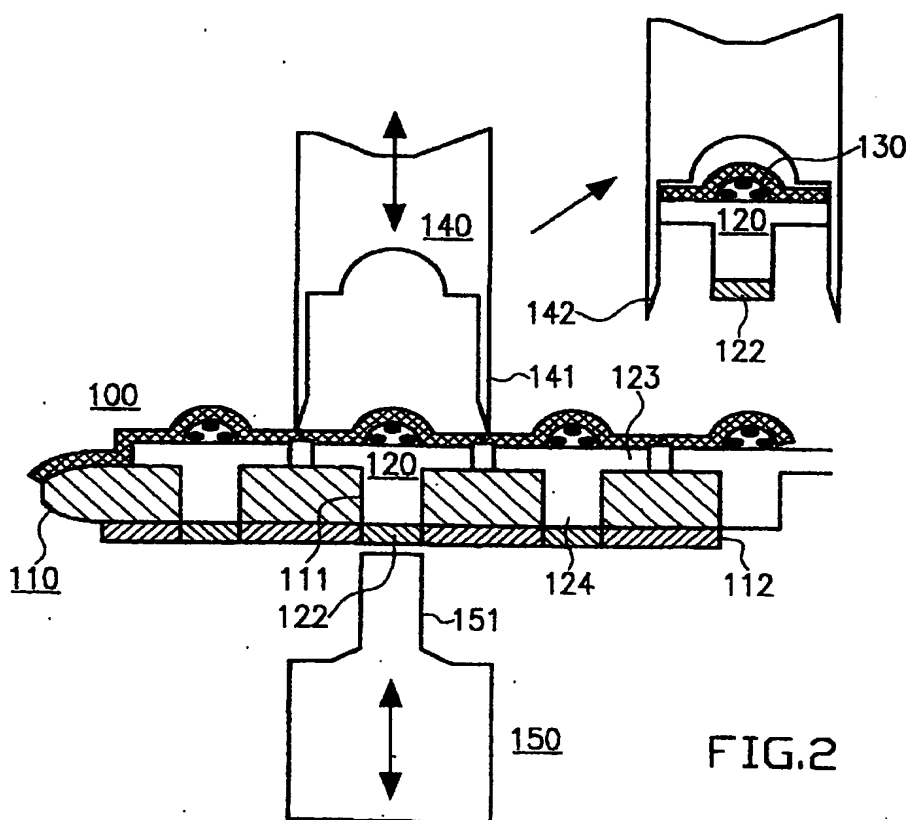


FIG.2

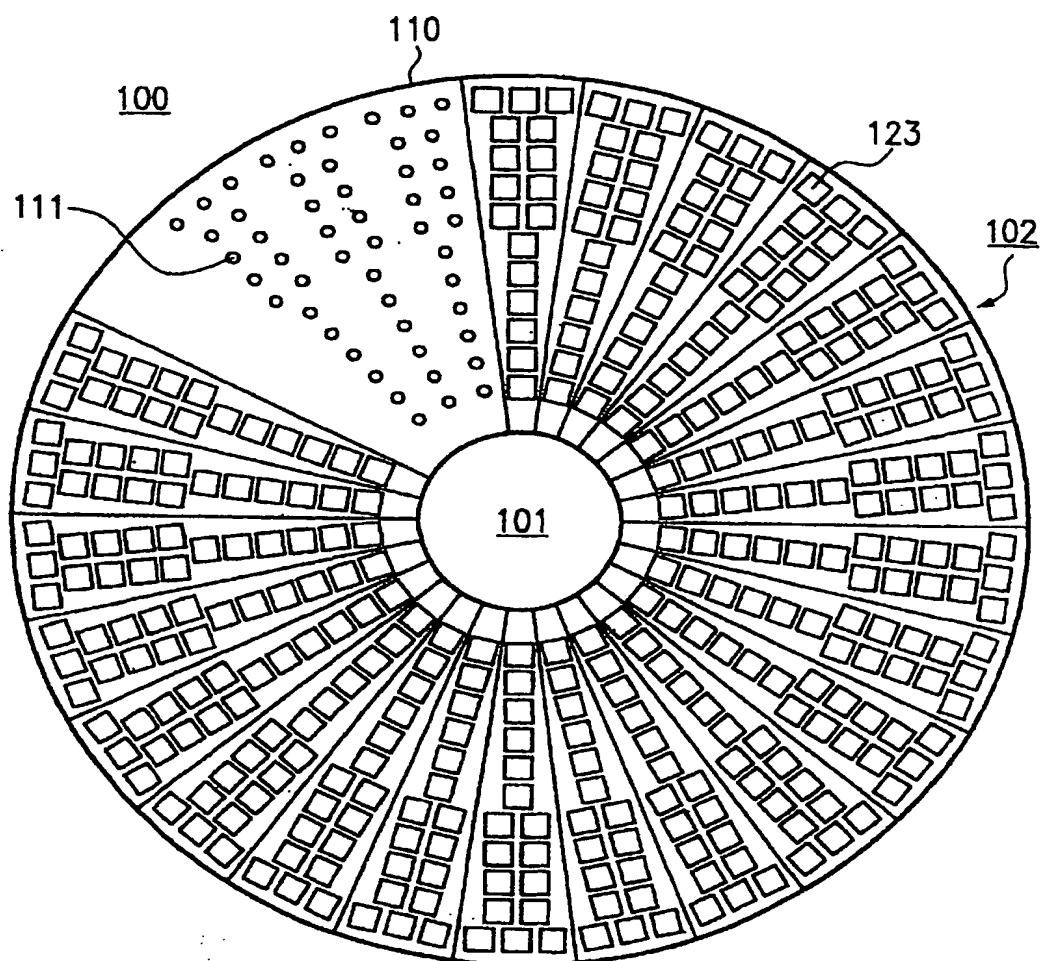


FIG.3

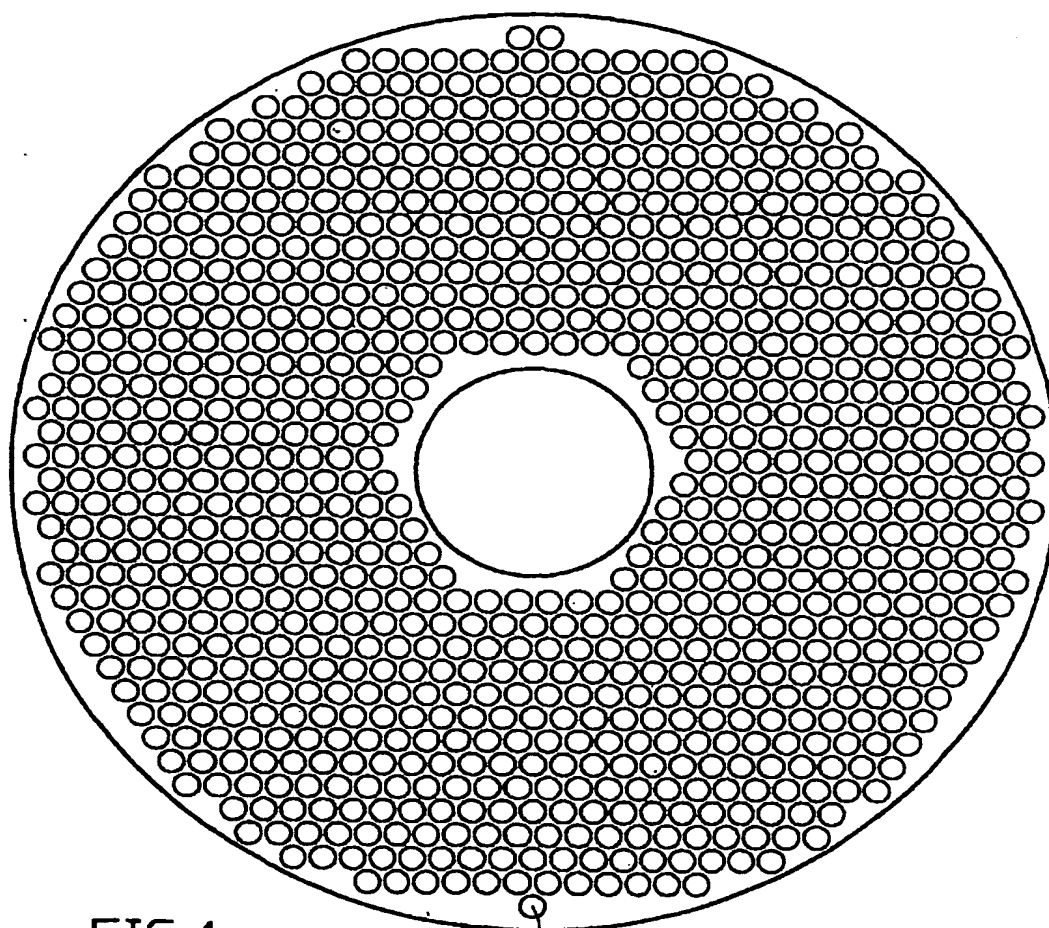


FIG. 4

123

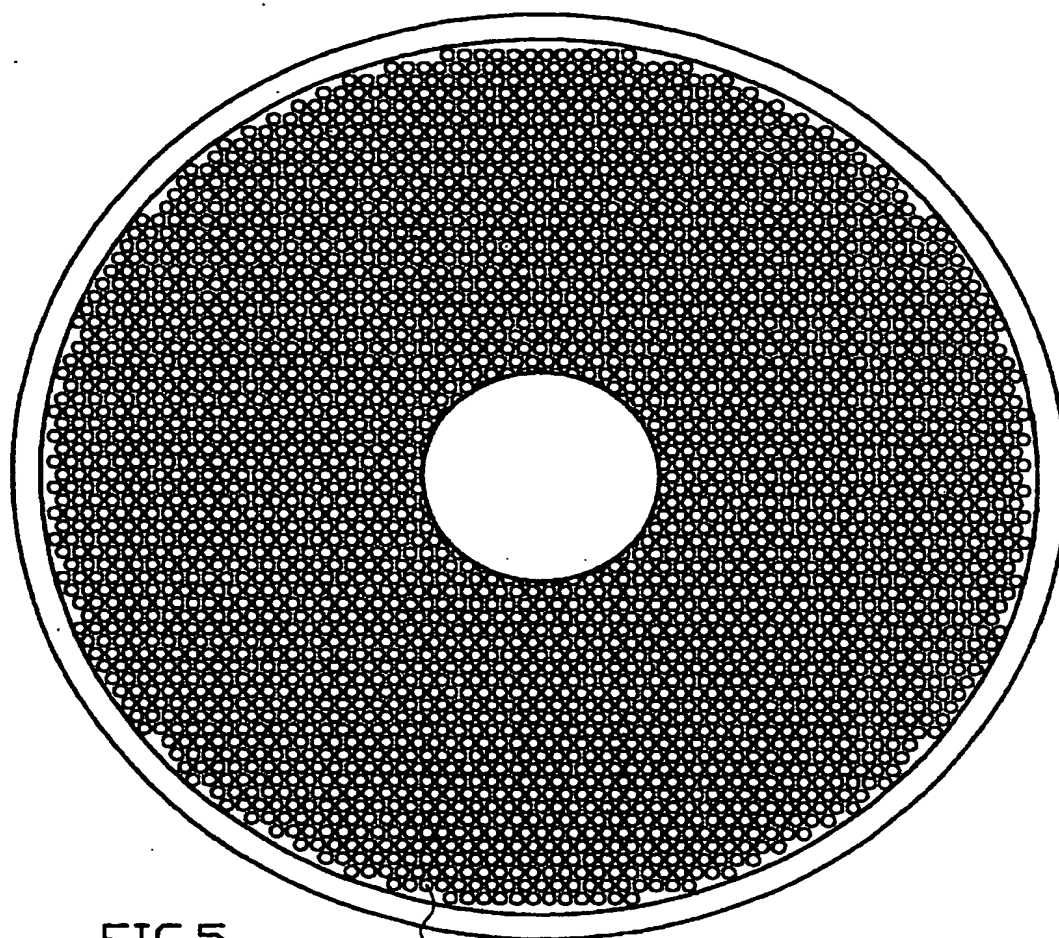


FIG. 5

123

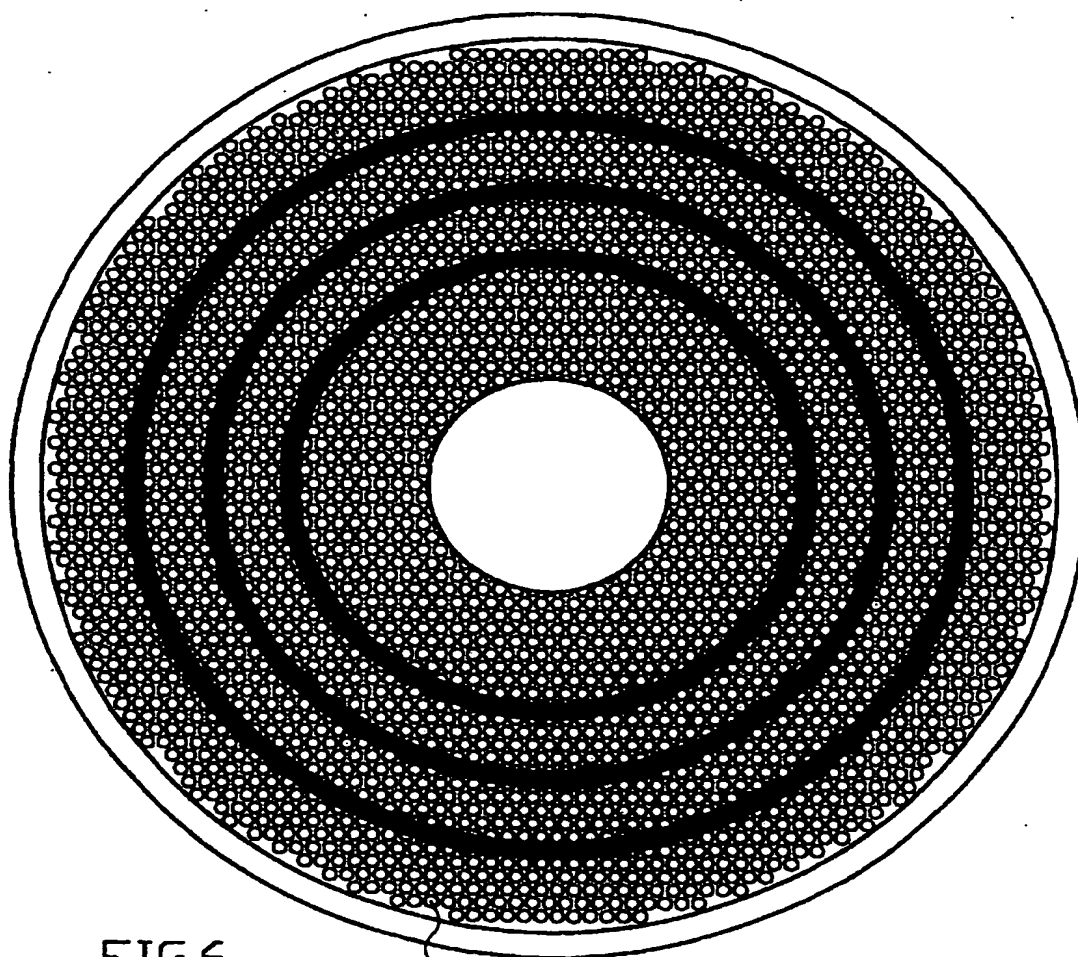


FIG. 6

123

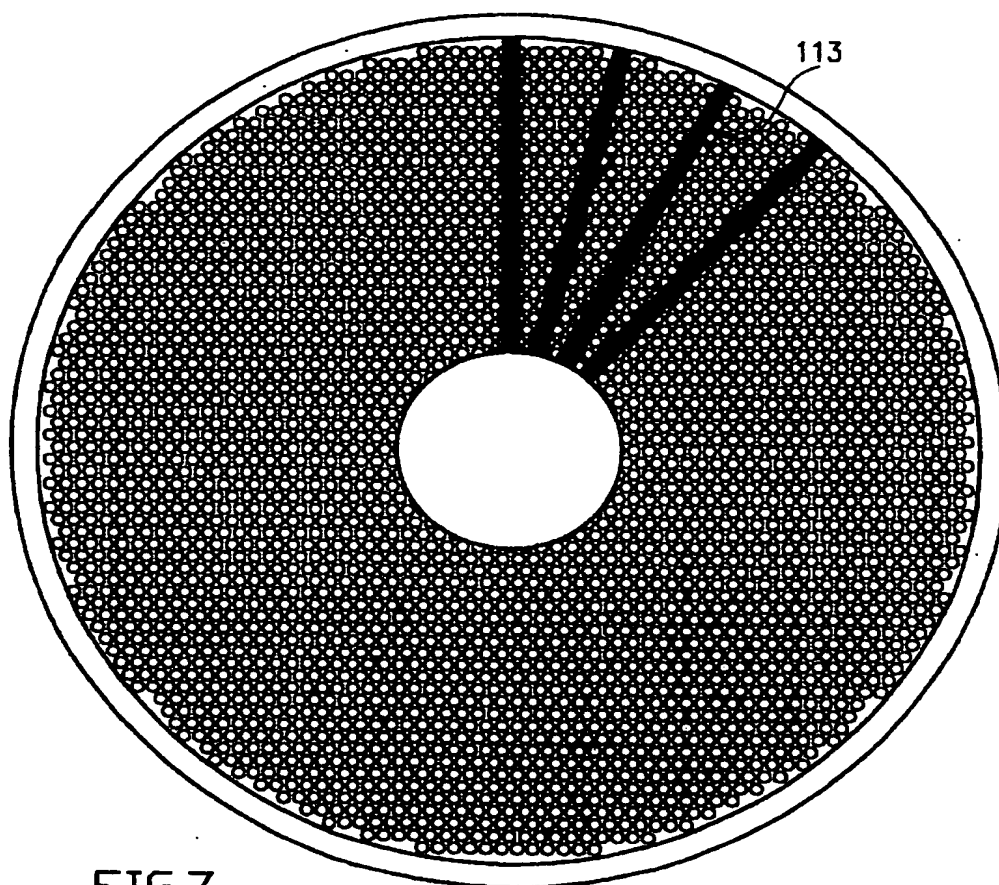


FIG. 7



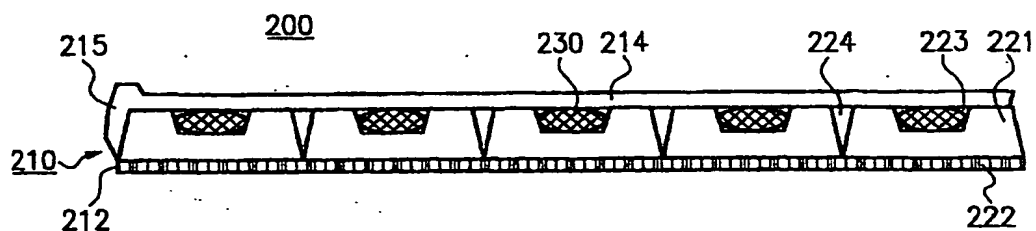


FIG. 8

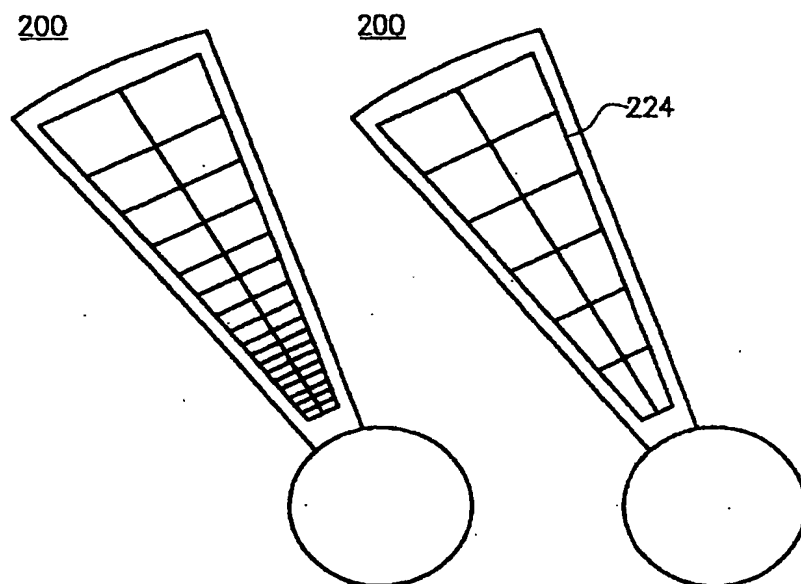


FIG. 9

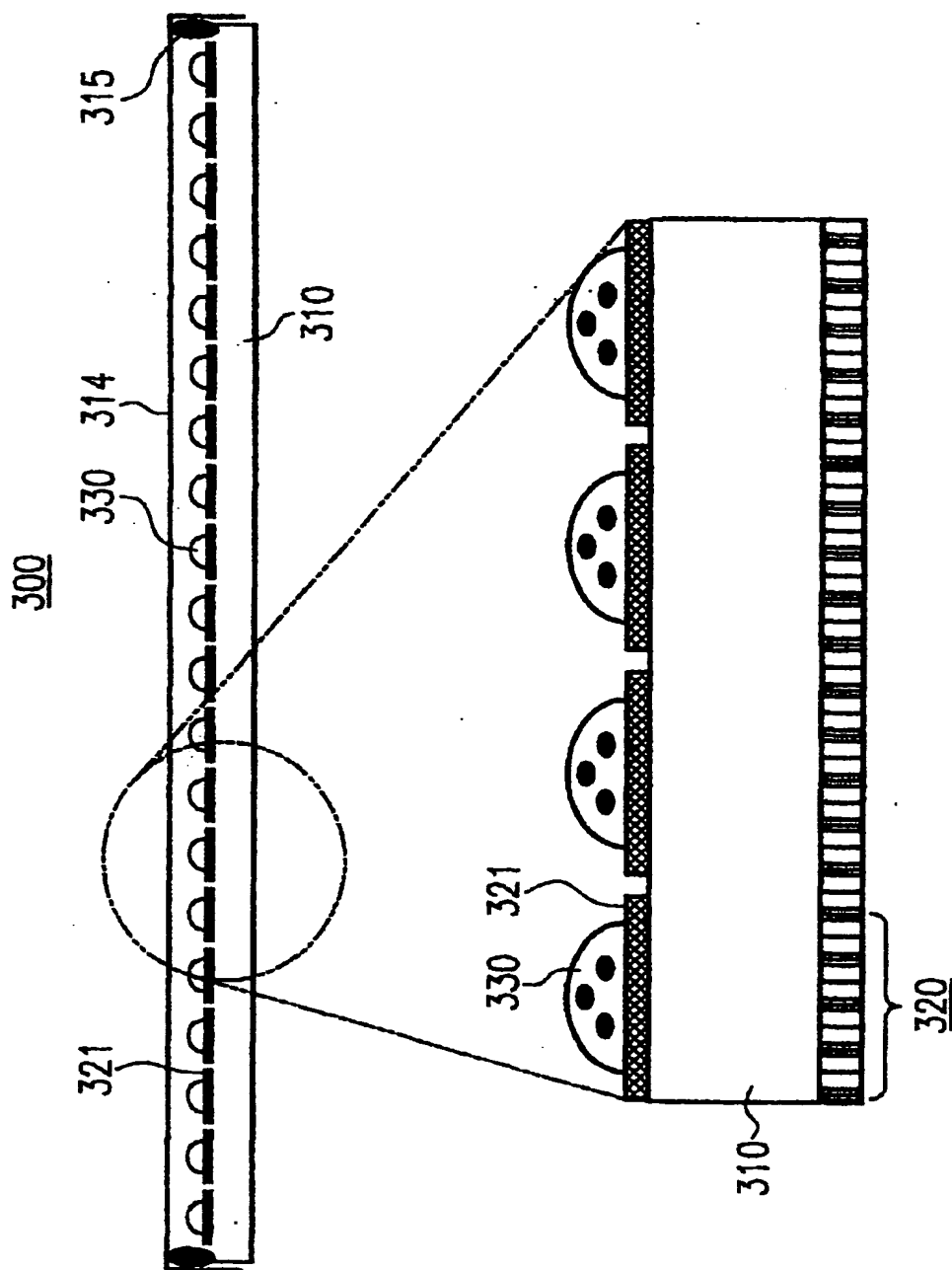
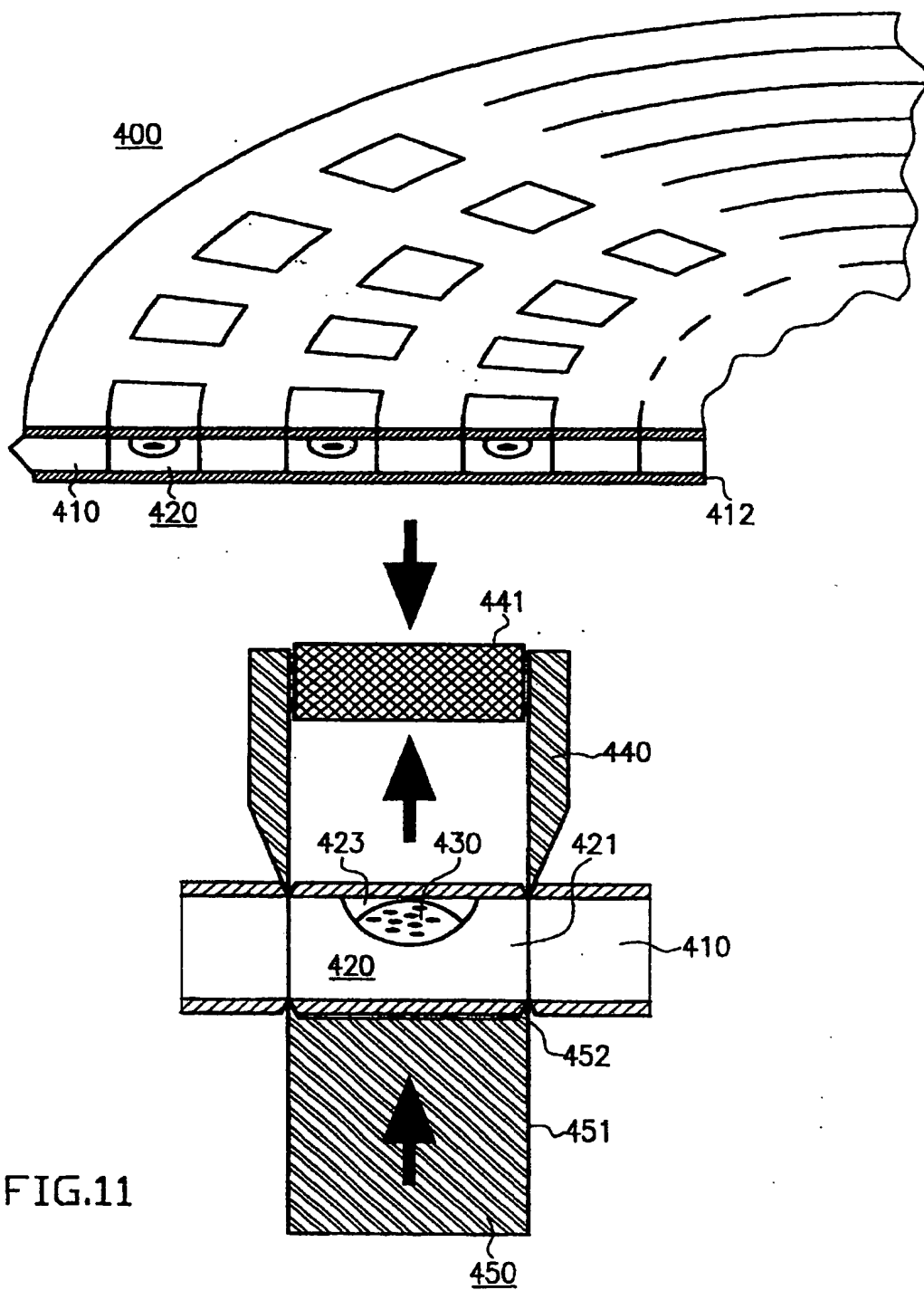


FIG. 10



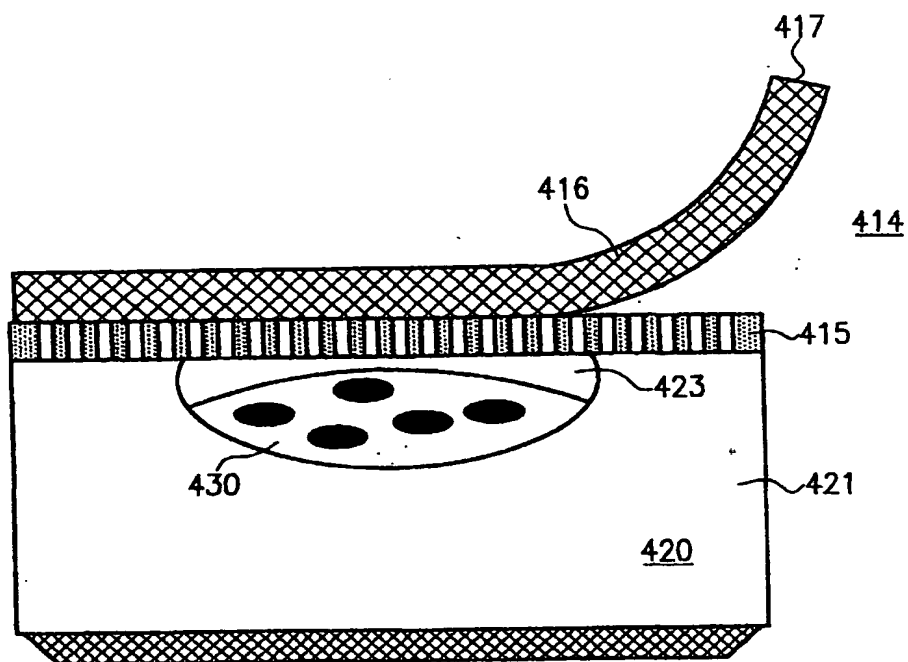


FIG. 12

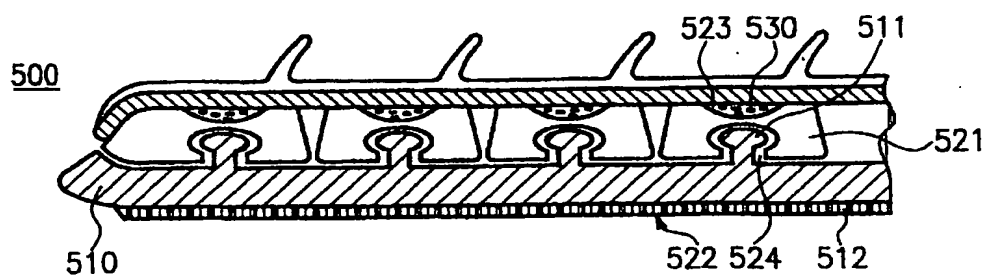


FIG. 13

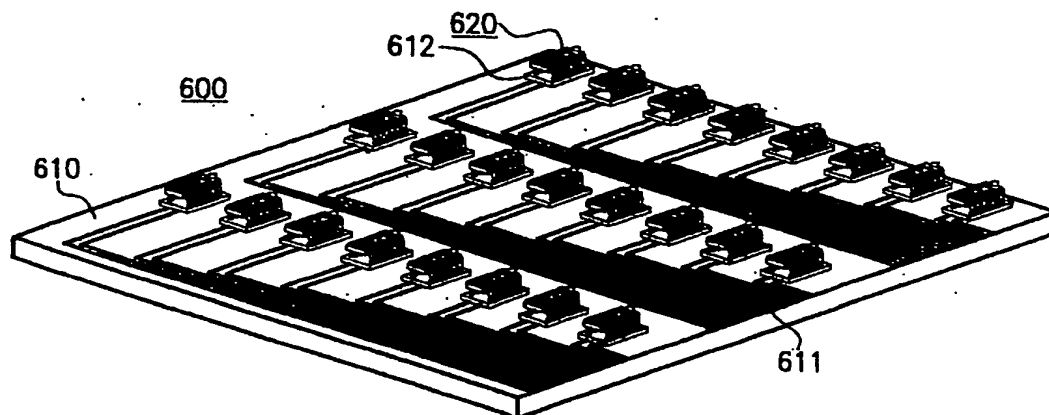
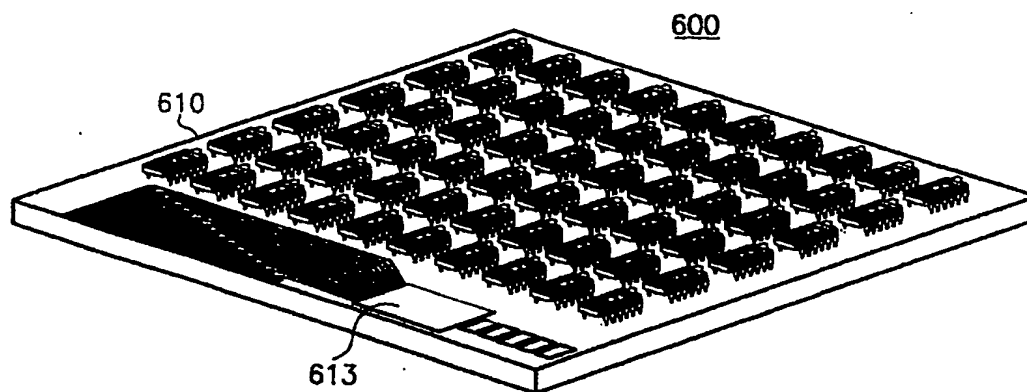
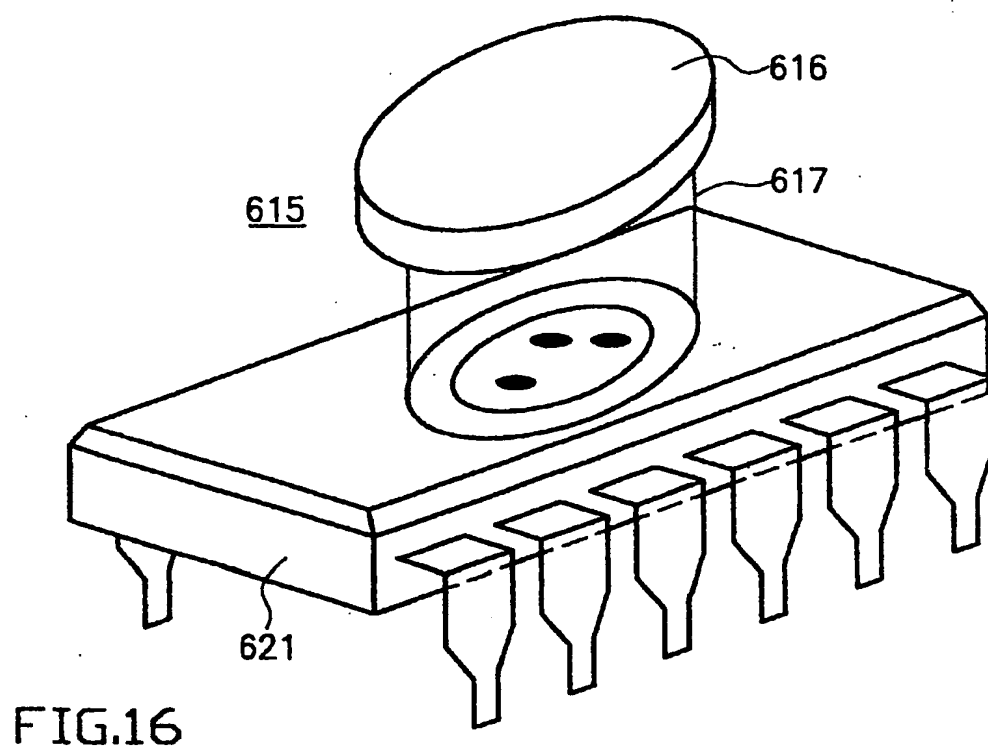
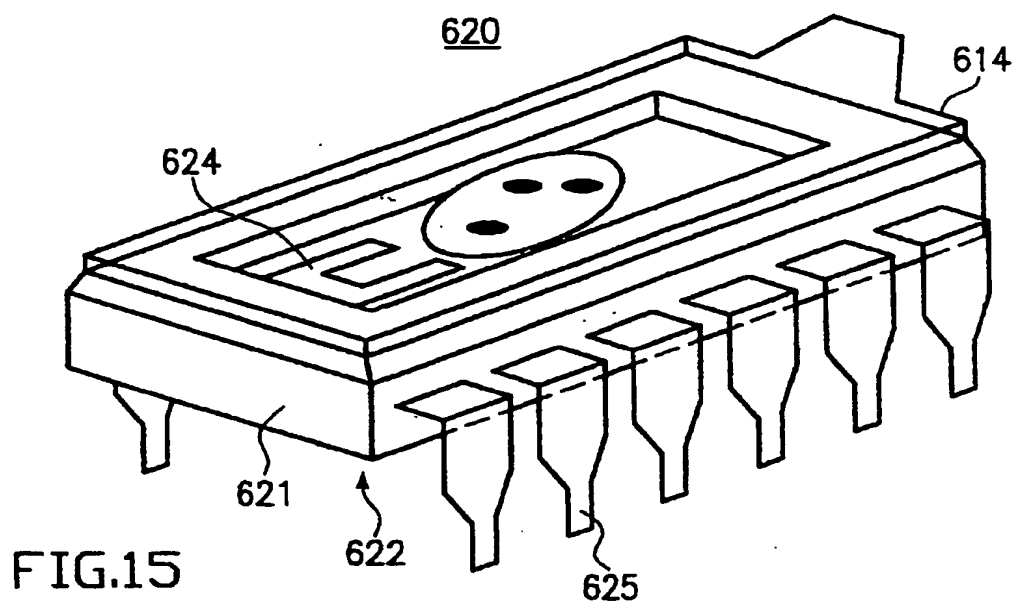


FIG. 14

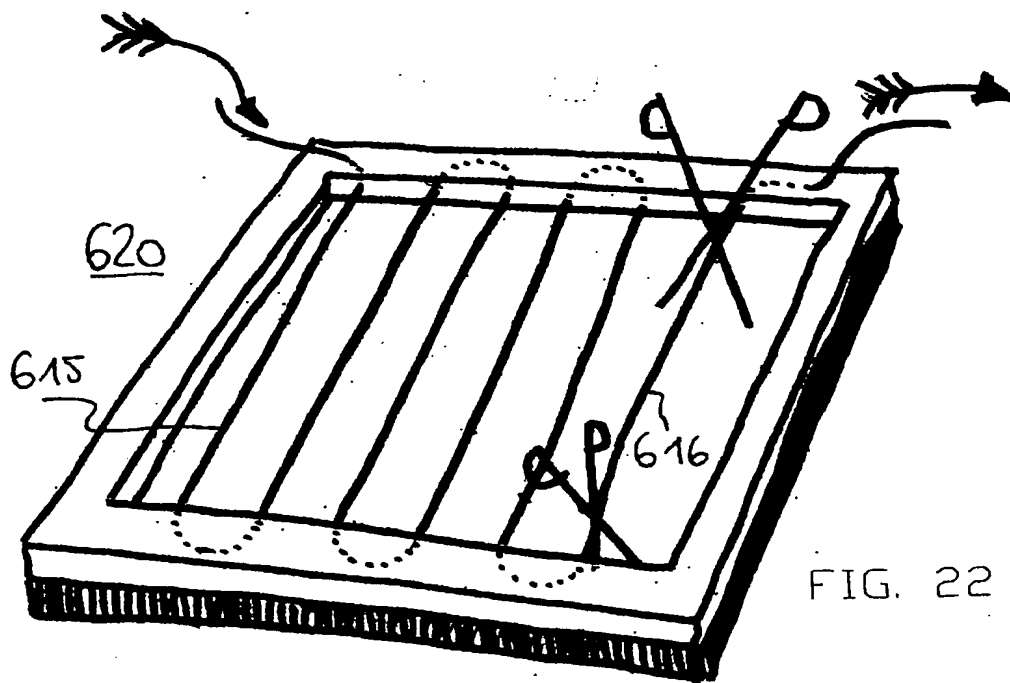
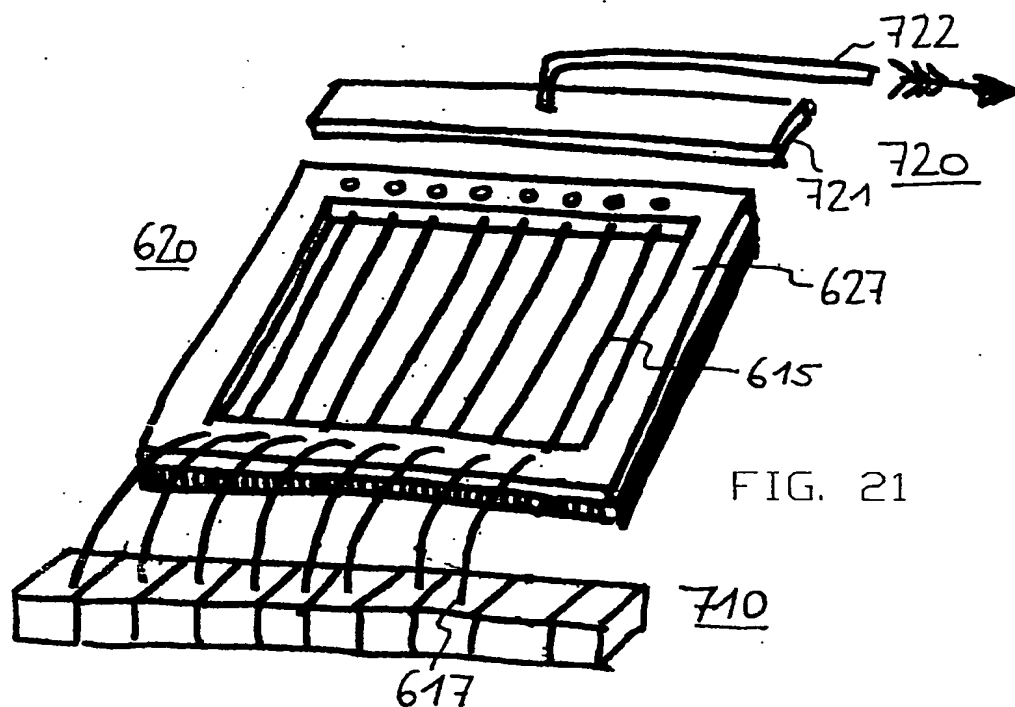


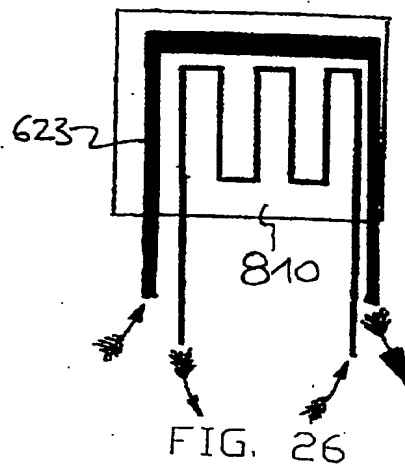
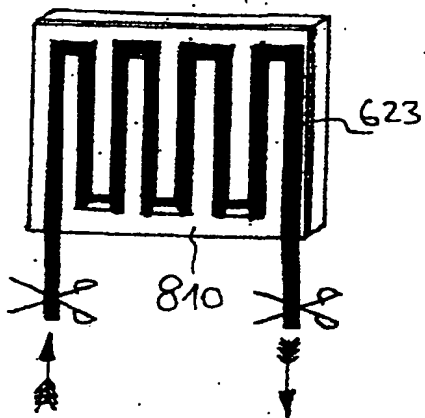
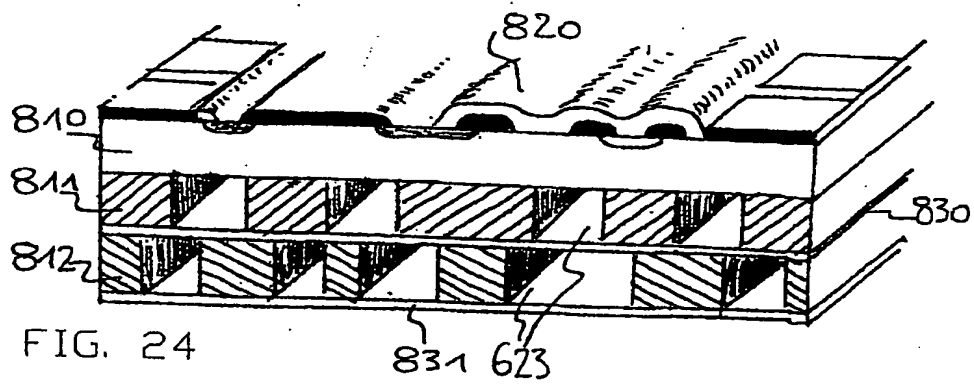
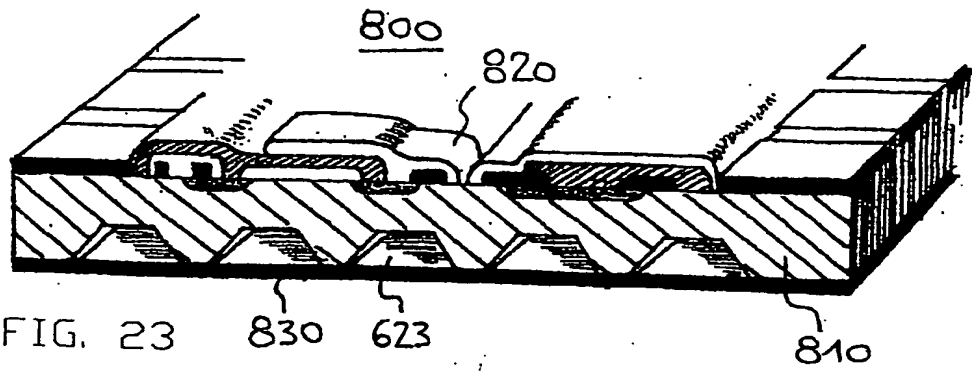












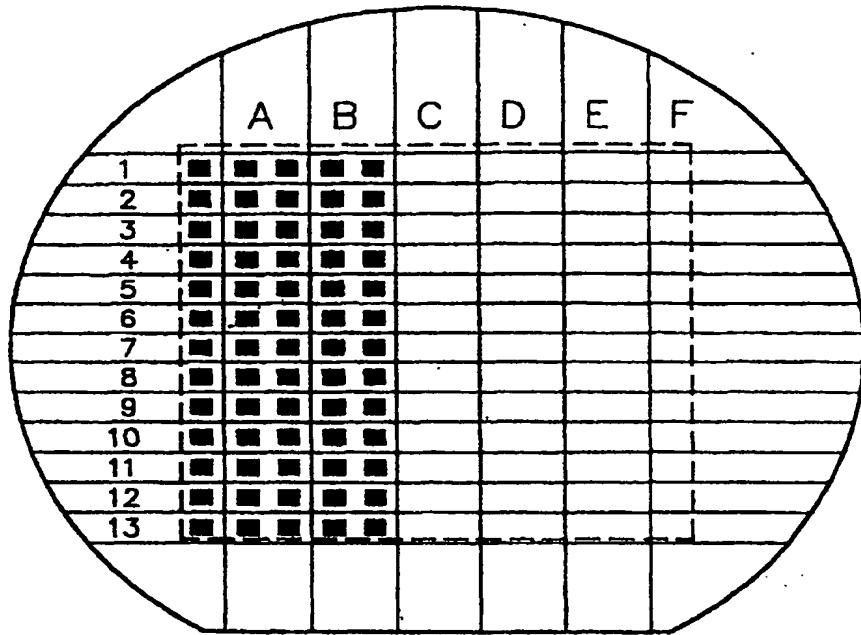


FIG. 27  
Stand der Technik

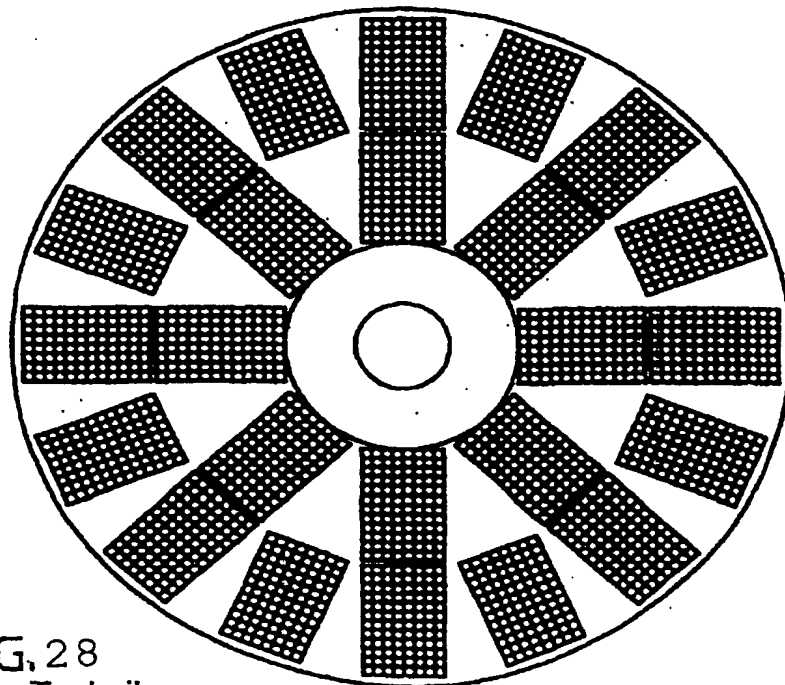


FIG. 28  
Stand der Technik

## CRYOSTORAGE METHOD AND DEVICE

[0001] The present invention relates to methods for cryo-storage of specimens, in particular, for the production, storage, and manipulation of biological specimens in a cryo-preserved or in a thawed condition, such as, for example, a cryo-preservation method for biological cells. The invention relates also to methods for writing and reading of data. The invention further relates to a device for cryo-storage of specimens, in particular, a storage substrate for biological specimens, such as, for example, cells or cell components, a device for writing and reading of data in storage media and a cryo-bank system. The invention also relates to uses of the cryo-preservation of biological specimens.

[0002] Cryo-preservation is a commonly known method for maintaining in particular biologically or medically relevant materials. These materials include, for example, tissue and organs, body fluids, or also individual cells or cell components. The cryo-preservation takes place according to predetermined procedures in containers or on substrates, whose shape is adapted to the material or specimen. Containers for cryo-preservation are known, for example, for tissue and organs (see DE-OS 199 22 31, EP-A 0 853 238, DE-OS 197 25 768, DE-OS 199 05 163), for blood components (see, for example, DE-OS 198 26 350), and for cell or drop-shaped cryo-specimens (see, for example, U.S. Pat. No. 5,275,016, EP-B 0 475 409, DE-OS 199 21 236, EPB 0 804 073).

[0003] A general concern with the cryo-preservation of biological specimens is in the ability of the specimen to be identified. Cryo-preservation specimens must be able to be identified with reference to their origin and characteristics with a high degree of certainty, without the necessity of thawing. With the macroscopic specimens, this is not a problem, since organ or blood containers can be provided with an inscription. Locating the cryo-specimen takes place in dependence on storage systems of the respective cryo-bank.

[0004] With small cryo-specimens in the form of frozen suspension drops, cells, cell aggregates, or cell components, the identification of the cryo-specimens is considerably problematic. A cryo-specimen would be negligibly small compared with the inscription. Often, an interest exists in the cryo-preservation of a plurality of microscopically small specimens. The storing and identification of small cryo-specimens with inscriptions would be impractical. In addition, the cryo-preserved cell specimens are available in a disordered state with common preservation techniques, which are based on the spraying of cell suspensions on cool surfaces (see, for example, EP-B 0 475 409). Only large amounts of individual specimens can be preserved commonly and unspecifically.

[0005] With the preservation techniques described in EP-B-8-4 073 and DE-OS 199 21 236, an arranged placement and specific processing of even the smallest specimens on the cryo-substrates is possible. The specimen deposition takes place, for example, with the use of a micro-drop shooting device, which is controlled on the basis of predetermined target coordinates. The specimens are located on defined substrate positions, on which also a specific measurement of specimen properties and identification of the specimens is possible. The substrate can be provided with a

marking, in order to define the specimen positions on the substrate. For example, in DE-OS 199 21 236, for the matrix-type deposition of cryo-specimens in straight lines and columns, it is proposed that the substrate is provided with a designation of the columns and lines. This marking technique is illustrated in FIG. 27 (prior art).

[0006] The conventional marking of cryo-substrates according to FIG. 27 has the following disadvantages. While the identification of specimens is possible, however, only information about the positions is provided. The limited information content of the substrate marking, however, represents a problem since, in addition to the specimen identification, also additional data, for example, about the condition or the history of the specimen or about measurement results should be available. These data can be stored in a parallel-operated data bank. The separate operation of cryo- and data banks, however, represents a considerable risk for the certainty of the feature allocation to the individual specimens. This risk is critical in particular with human medical uses, since a specific mistake can defeat the success of a further use of the cryo-specimen. In addition, the substrate marking has the disadvantage that specimen identification is possible only in connection with the cryo-substrate. When a specimen removal takes place, for example, such as that described in DE-OS 199 21 236, after separation from the cryo-substrate, a specimen identification can take place only by an expensive measurement of specific characteristics in a thawed state.

[0007] From DE-OS 197 52 085, a specimen carrier for microscopic analysis of a plurality of specimens is known. The conventional specimen carrier is formed as a substrate with a plurality of specimen receiving spaces, as shown in FIG. 28 in schematic plan view (prior art). The substrate, for example, has the shape of a plate storage medium (for example, a CD). Between a passage hole in the substrate center and the associated matrix-type specimen-receiving spaces, a ring region is formed. From DE-OS 197 52 085, it is known to form these ring regions for storing specimen data. The common specimen carrier has the disadvantage that it can only be used for receiving liquid specimens and not for cryo-preservation. In addition, the storage of specimen data on the inner ring represents the same disadvantage as the above-described substrate marking. More data can be stored; however, the association to the individual specimens is not possible without errors.

[0008] In addition to the noted disadvantages of the common technology, the following basis also exists for the minimally developed use, until now, of cryo-preservation, in particular, in cellular biotechnology. If a direct freezing of biological specimens takes place in a liquid cooling phase (for example, nitrogen), a risk of contamination exists. Over the cooling phase, viruses can be transmitted to the specimens. In order to avoid this risk, the contact with the liquid phase must be avoided or a sealed covering of the specimens must take place. Up to now, this has not been able to be realized in a practical manner.

[0009] From labor technology, specimen carriers, for example, in the form of object carriers or micro-titer plates are known, which are equipped with data storage media. These conventional specimen carriers are not suited for cryo-storage. First, they are merely suited for a use at ambient room temperature or a refrigerator temperature

above the freezing point of water. A use at low temperatures has not been provided up to this point. Second, conventional specimen carriers are provided as substrates for specimens. Treatment, manipulation, or cultivation of the specimens takes place on the substrates. For storage in a preserved state, the conventional specimen carriers, however, are not suitable. In this connection, the containers for cryo-preservation are used, as described above. Finally, the conventional specimen carriers are not suitable for an effective specimen storage and manipulation. In practice, they must be manually transported; storage with high density is impossible.

[0010] The object of the present invention is to provide an improved method for cryo-preservation, with which the disadvantages of the conventional techniques are overcome, which has a broader range of use, and in particular, which is suited for automated preservation storage. The new method for cryo-preservation should make possible, in particular, that the specimen data are accommodated in greater amounts and with a higher data certainty (that is, with increased certainty of the association of specimen data to determined specimens). The invention also makes possible a highly specific data association to individual cryo-specimens. The object of the invention is also to provide devices for implementation of the improved cryo-preservation methods described above.

[0011] These objects are solved with the methods or devices with the features of patent claims 1, 12, 21 and 22. Advantageous embodiments and uses of the invention are provided in the dependent claims.

[0012] The basic idea of the present invention is to arrange at least one specimen on a substrate and on the substrate, to provide storage of specimen data, which are characteristic for the features of the cryo-specimen. The storage of the specimen data takes place position-specific in a specimen data storage medium, preferably, at the storage position of the respective specimen. By means of the storage of specimens and specimen data on common or closely adjacent or adjoining positions of the substrate, a series of advantages is achieved. The specimen data are clearly associated by means of their storage positions to the respective specimens. A mistake in specimen association is impossible. Upon removal of specimens, the associated data can be simultaneously read or removed with the storage medium from the substrate, so that also, after the removal of the specimen, with further processing, the identification of the specimen and the association of the specimen data are ensured. A removal of individual specimens at desired temperatures, in particular, also in a frozen state, can take place.

[0013] A considerable improvement that can be achieved with the present invention is that, first, methods and suitable devices can be provided, which are directly optimal for storage and preservation of biological specimens over long periods of time (months and years) at low temperatures (for example, below  $-50^{\circ}\text{C}$ ). With the invention, a new area of use with operating temperatures for the use of data storage has been made available, which, prior to the invention, was not utilized.

[0014] Depending on the use, the specimen deposition and the data storage can take place at ambient room temperature with subsequent cooling to a required preservation temperature or also in a cooled state. The inventors have surprisingly

found that writing as well as reading of data in or out of the known storage media (for example, optical storage, magnetic storage, electromagnetic storage, FLASH storage), or in special storage media for the object of cryo-storage at preservation temperatures beneath the freezing point of water are possible. The specimen data sets are reliably readable in all phases of a cryo-preservation process. The readability of data storage at these types of low temperatures, that likewise, exclude a writing of data, represents an advantage known to the inventors, which amounts to a broader usability of the inventive cryo-storage.

[0015] Particularly advantageous to the present invention is the deposition of a plurality of specimens on a common storage substrate with a position-specific storage of a plurality of specimen data sets. The storage substrate serves simultaneously as a cryo-substrate with specimen carriers for receiving, retaining, and releasing cryo-specimens and as data carriers, which stores a plurality of data on the substrate position corresponding to the respective specimen positions, as in a storage medium known in computer technology. The specimens are applied in portions (for example, in drops) and isolated from one another as cell suspension volumes (for example, as cell suspension drops) on or in the specimen carrier of the cryo-substrate. Each specimen carrier is associated with a specimen data storage medium, in which associated data are stored. The simultaneous storage of specimens and specimen data takes place, such that it is stable over long periods of time and it is safeguarded from mix-ups. The inventive cryo-preservation is designated as "cryo-storage", because of the analogy to electronic data storage.

[0016] According to a preferred embodiment of the invention, the cryo-storage takes place on a storage substrate with at least one cryo-storage element. Each cryo-storage element includes a specimen carrier and a specimen data storage, which form therewith an integral component, which is removable reversibly or irreversibly from the substrate. The specimen carrier and the data storage form a secure connection, which is attached removably on the storage substrate for cryo-storage. In order to remove a specimen from the storage substrate, the entire cryo-storage element is removed from the storage substrate. A subject of the present invention is also the cryo-storage element, which includes a specimen carrier for receiving a cryo-specimen and a specimen data storage for storage of associated specimen data. According to a preferred embodiment of the invention, a storage substrate is formed by a base body, which preferably has a flat shape, with a plurality of cryo-storage elements. The storage substrate can have a predetermined two- or three-dimensional geometric form, depending on the use. According to a preferred embodiment of the invention, the base body of the storage substrate has the form of an optical storage plate (CD-ROM), in which the cryo-storage elements are integrated, or at least one circuit board, on which the cryo-storage elements, like electrical circuits (chips), are placed.

[0017] A subject of the present invention is also a method for operating a cryo-bank with a plurality of storage substrates. On at least one storage substrate, a plurality of specimens are stored, which, for example, belong to an organism (test subject). The specimens include, for example, one or more specific cells of the test subject (for example, stem cells, tissue cells). First, the storage of the specimens

takes place commonly with the specimen-specific data, in particular, data for identification of the type of specimen and test subject, identification of the preservation time point, and identification of measurement data at the time point of the preservation. In the operation of the cryo-bank, specimens are removed commonly with the associated specimen data for measurement purposes, diagnostic objectives, or therapeutic methods, and/or to supplement further specimens or specimen data. The specimen data include generally all features and parameters of the specimen and the specimen donor, and if need be, additional information for data storage on the storage substrate. An inventively used specimen data storage has a storage capacity of at least 4 megabytes, for example.

[0018] By means of the following advantageous features of the inventive cryo-storage, the disadvantages of conventional planar or three-dimensional substrates are overcome. The specimens (for example, frozen cell suspension volumes) are specifically accessible at any point in time. This is also true for a low temperature state. The smallest specimen volumes can be arranged at defined substrate positions, which have characteristic dimensions in the mm-range or less, preferably, however, typically amounts of  $10^3 \mu\text{m}^3$  ( $10 \cdot 10 \cdot 10 \mu\text{m}^3$ ) to some  $10 \text{ nm}^3$ . The specimens can contain, for example, one or a plurality of cells ( $10^2$  to  $10^6$  cells), cell components, biologically relevant objects (such as, for example, membrane vesicles, DNA materials, macromolecules) and/or cell bonds. The specimens can be arranged with a high density, the cryo-storage having an increased effectiveness.

[0019] The specimens can be removed selectively in a deep-cooled state of the storage substrate, without interrupting the cooling of the remaining specimens. For specimen reduction and data reading, no thawing of the entire storage substrate is necessary.

[0020] The specimen data can be automatically written or read supported by a computer. The association of the specimen data storage and specimen carriers is unique. The specimens are stored, such that they are safeguarded from misidentification. The association of the removed specimens to the specimen data and also to the storage substrate is maintained, so that the history of a specimen can be recapitulated. This represents a particular advantage with medical uses of the invention.

[0021] The cryo-storage elements of the present invention are preferably made with the use of low-temperature compatible plastic material, which, on the one hand, forms the specimen carrier and on the other hand, forms an embedding for the specimen data storage. The plastic material can tolerate repetitious temperature changes without change and without damage. Preferably, a plastic material is used, whose water absorption capacity amounts to <1% of the dead weight, in particular, <0.1% of the dead weight. The cryo-storage elements according to the present invention are based, for example, on polyurethane, poly-tetra-fluoroethylene, or polyethylene. The storage substrate of the present invention advantageously has a high mechanical stability and a long-term durability. The inventive cryo-storage makes possible for the first time a secure storage of biological specimens over decades. A cryo-bank can be reliably operated over the entire longevity of a donor (test subject), for example, for the duration of a human life. The storage

substrate has a relatively simple structure, which makes possible an abundant use of the storage substrates in cryo-banks.

[0022] The invention also has advantages with reference to the noted contamination risks. The inventive storage substrate makes possible a series of features to be described below, by means of which a liquid cooling medium is prevented from coming into contact with the specimens. Viral contamination is avoided over the cooling phase. Also, the condensation of water or other substances on the specimens is impossible.

[0023] A further important advantage of the storage substrate of the present invention is that the stored specimens are accessible in a cryo-preserved or thawed state of the common measurement and analysis methods (for example, optical measurement, microscopic analyses) with simultaneous readability of the data phases. The data in the specimen data storages are also maintained with multiple freezing or thawing processes.

[0024] The cryo-storage takes place with conservation conditions chosen depending on the application. The temperature of the cryo-storage and the chronological cycle of decreases or increases in temperature are selected based on the preservation object and the material. The preservation temperature lies in a region below the ambient room temperature, preferably, below the freezing point of water with normal pressure and with the preferred long-term use, below  $-80^\circ \text{C}$ . The cryo-temperature is preferably adjusted by means of a liquid cooling medium (nitrogen) or the vapor of the cooling medium.

[0025] The invention has the advantage that the smallest specimen volumes can be cryo-preserved. This makes possible fast temperature changes, reproducible preservation conditions, and an individual specimen manipulation, treatment, or measurement.

[0026] Further advantages and characteristics of the invention are described with reference to the attached drawings. In the drawings,

[0027] FIG. 1 is a schematic sectional view of a part of the inventive storage substrate according to a first embodiment of the invention;

[0028] FIG. 2 is a schematic illustration of a specimen removal from a storage substrate according to FIG. 1;

[0029] FIGS. 3 through 7 are schematic plan views of various forms of specimen and storage arrangements on a storage substrate;

[0030] FIG. 8 is a schematic sectional view of a part of a storage substrate according to a second embodiment of the invention;

[0031] FIG. 9 is a schematic view of various geometric arrangements of cryo-storage elements;

[0032] FIG. 10 is a schematic sectional view of a part of a storage substrate according to a third embodiment of the invention;

[0033] FIG. 11 is an illustration of the removal of cryo-specific elements from an inventive storage substrate according to a fourth embodiment of the invention;

[0034] FIG. 12 is a schematic illustration of a film-like cover on an inventive storage substrate;

[0035] FIG. 13 is a schematic sectional view of a part of a storage substrate according to a fifth embodiment of the invention;

[0036] FIG. 14 are schematic perspective views of storage substrates according to a sixth embodiment of the invention;

[0037] FIG. 15 is a schematic perspective view of a cryo-storage element of the storage substrate according to FIG. 14;

[0038] FIG. 16 is a schematic perspective view of a modification of the cryo-storage element according to FIG. 15;

[0039] FIGS. 17 through 20 are schematic perspective views of the inventive cryo-storage element according to further embodiments of the invention;

[0040] FIGS. 21 and 22 are schematic illustrations of the loading of the specimen carriers and the removal of the specimens;

[0041] FIGS. 23 through 26 are schematic perspective views of the inventive storage substrate according to further embodiments of the invention; and

[0042] FIGS. 27 and 28 are plan views of conventional specimen carriers (prior art).

[0043] According to the present invention, at least one specimen is arranged in a specimen carrier on a substrate and on the substrate, storage of specimen data is made, which are characteristic for features of the cryo-specimen. The storage of the specimen data takes place position-specific in a specimen data storage, preferably, at the storage position of the respective specimen. The connection on a specimen carrier for receiving a cryo-specimen and a specimen data storage for storage of associated storage data is designated as a "cryo-storage element". An inventive storage substrate is preferably formed as a base body, which preferably, has a flat form, with a plurality of cryo-storage elements.

[0044] With the first embodiment of the inventive storage substrate 100 shown in FIG. 1, a base body 110 is provided, which supports a plurality of cryo-storage elements 120. The base body 110 (shown in cut-away manner) has typical dimensions, such as, for example, an optically readable/writable storage plate (in the following: CD, diameter approximately 12 cm, for example). For receiving the cryo-storage element 120, the base body 110 has passage openings 111, in which the cryo-storage elements sit in a type of a press fit. On one side of the base body 110, a film-type storage medium 112 is arranged. The storage medium 112 is a data layer, such as the type that is known for common CD's and that is suitable for reading and writing of data. The storage medium 112 preferably is designed for optical writing ("burning") and reading of data. However, it also can be a magnetic or a topographic storage medium. On the storage medium 112, a protective layer is provided, if necessary (not shown).

[0045] The storage medium 112 includes layer regions, which lie on the base body 110 and serve as base storage 113, and regions, which are associated with the cryo-storage elements 120 and serve as specimen data storage 122. The base storage 113 and specimen data storage 122 first can

form a closed layer of the storage medium 112, which after specimen removal (see FIG. 2) is broken, when necessary. The base storage 113 contains preferably substrate data, which, for example, relate to the type of the arrangement of the cryo-storage elements and the identification of the substrates. The specimen data storage 122 contains specimen data (see below).

[0046] The cryo-storage elements 120 comprise, respectively, a specimen carrier 121 and the specimen data storage 122. The specimen carrier 121 is a formed component made of plastic with a T-shape, plate-shape, or mushroom shape. The specimen carrier, instead of being made of plastic, can comprise a bio-compatible and inert material (for example, semi-conductor material). The specimen carrier 121 includes a plate-type specimen receptacle 123 and a carrier pin 124. The inner shape of the passage openings 111 and the outer shape of the carrier pin 124 are complementary for forming a press-fit to one another. Between the edges of the specimen receptacles 123, gaps 125 are formed. The gaps 125 reduce the risk of a mutual contamination between the specimens. In addition, they simplify the removable from the cryo-storage elements. With the carrier pins 124, the respective specimen storage 122 is securely connected.

[0047] On the specimen receptacles 123, the cryo-specimens 130 are arranged, in particular, in the form of frozen liquid drops. The drops are cell suspensions or also reference specimens, for example, with samples of cultivation media, solutions of marking dyes, or probe specimens. Probe specimens are reference specimens, which contain substances that react sensitively to a change of critical environmental conditions. As probe samples, for example, chemical compounds can be used, which are sensitive to radioactive radiation or unwanted temperature increases. A control of the probe specimen makes possible a monitoring of the storage condition of the storage substrate in a cryo-bank.

[0048] A cover film 114 is arranged over the cryo-specimens 130, which serves to avoid contamination from the cooling medium or from the environment. Typical dimensions of the specimen receptacles 123, for example, are 0.1 to 3 mm. The entire thickness of the storage substrate 100 amounts to approximately 2 mm, for example.

[0049] For the inventive cryo-storage of specimens, a storage substrate 100 (without the cover film 114) is first loaded with the cryo-specimens and reference specimens, if necessary. The loading takes place, for example, with a micro-drop shooting device, such as that described in EP-B 0 804 073. The specimens are shot as micro-drops in a cooled state of the storage substrate 100, aimed at the specimen receptacles 123, where, upon impingement, they freeze. Likewise, in a deeply cooled state of the storage substrate 100, writing (for example, a burning) of a first specimen data takes place in the specimen data storage 122. After loading of the substrate, the application of the cover film 114 and the insertion of the storage substrate in a support under the respective cooling conditions of the cryo-preservation system that is utilized take place.

[0050] In FIG. 2, the removal of specimens from the storage substrate 100 is illustrated. According to the present invention, the specimen removal takes place by separating the respective cryo-storage element 120 from the base body 110. The separation takes place with a cutting device 140 in cooperation with a punching device 150. The cutting device

has a hollow cutting tool 141, whose blade is adapted to the outer shape of the specimen receptacle 123. The cutting tool, for example, can be formed as a hollow capillary with a ground end. The punching device 150 comprises a punch 151, with which the specimen data storage 122 is separated from the remaining storage medium 112 and the carrier pin 124 can be pressed out of the passage opening 111. On the end of the punch 151, if necessary, also a cutting tool for improved transection of the storage medium 112 is provided. The cutting and punching devices 140, 150 can be actively or passively cooled for maintaining a predetermined temperature of the storage substrate 100.

[0051] FIG. 2 shows a particular advantage of the invention. With the cutting device 140, the specimen 130 is removed with the cryo-storage element 120, without opening the other specimen deposits. The specimen 130 is also connected with the specimen data storage 122 after the removal. A transfer of the specimen to another storage substrate and/or a measurement device under cryo-conditions or with increased temperature can take place. A supplement of specimen data, for example, in dependence on a measurement result, is provided on the specimen data storage 122 (data accumulation).

[0052] FIGS. 3 through 7 illustrate inventive storage substrates (for example, according to FIG. 1) in schematic plan view. A storage substrate 100 is formed like a conventional CD and has in the center, in particular, a passage opening 101 for mounting of the storage substrate in the cryo-preservation device and/or a reading/writing system. The specimen receptacles 123 of the specimen carrier are formed in this embodiment as rectangles. They have typical surface dimensions of approximately 0.1 to 30 mm<sup>2</sup>. The specimen receptacles 123 are arranged in groups in sectors 102. Upon removal of specimens with the respective cryo-storage elements, the base body 110 remains back with the free passage openings 111.

[0053] FIG. 4 shows a modified embodiment with circular specimen receptacles 123. On each specimen receptacle 123, a drop with a volume of some mm<sup>3</sup> can be stored. Each drop can contain up to 10<sup>5</sup> cells. On the entire storage substrate with a diameter of approximately 12 cm, therefore, up to 10<sup>8</sup> cells can be stored.

[0054] FIG. 5 shows a modified form with circular specimen receptacles 123, which, in comparison to FIG. 4, have smaller diameters (for example, 0.01 to 1 mm). The entire number of the cryo-storage elements on the storage substrate 100 is thereby increased. The variability increases with the specimen removal.

[0055] The base storage 113 illustrated in FIG. 1 can be arranged selectively according to determined channels in the storage medium. This is illustrated in FIG. 6 (ring-shaped storage channels) and 7 (ray-like, aligned storage channels). With the base storage 113, an additional fragmentation of the storage substrate takes place.

[0056] FIG. 8 illustrates in a cut-away manner a modified form of a storage substrate 200 with a base body 210, which is formed by the specimen carrier 221 of the cryo-storage element. The specimen carrier 221 has the specimen data storage 222 on one side and on the opposite side, the specimen receptacles 223. The specimen carriers 221 are formed components, for example, made of plastic or a

semiconductor material, in which the specimen receptacles 223 are formed as recesses. The specimen carriers 221 are connected to one another via breaking points. The specimen data storage 222 forms a layer of the storage medium arranged on the underside of the base body 210. On the upper side of the storage substrate, a cover film 214 is provided, with which the specimens 230 are covered. The cover film 214 encompasses the base body 210 on its outer edge with a circulating projection 215.

[0057] The use of the storage substrate 200, in particular, the loading and the data storage, takes place according to the above-described principles. For data removal, cryo-storage elements 220 are separated respectively with a carrier 221 and a specimen data storage 222 with a suitable tool from the storage substrate 220 (for example, broken off, cut off, or the like). Depending on the application, the breaking points 224 are designed with a determined geometry, as illustrated in FIG. 9.

[0058] In FIG. 9, the white lines designate the distribution of the breaking points 224. In the respective framed black regions, the specimen carriers, in particular, with the specimen receptacles, are arranged. The specimen receptacles can have various geometries within the storage substrate 200, for example, toward the interior, they can be more compact (left drawing part) or narrower (right drawing part).

[0059] A third embodiment of the storage substrate 300 of the invention is illustrated in FIG. 10. The storage substrate has a disk-shaped base body 310 in the form of an even, uniform plate. Joints or breaking points are not provided in this embodiment. The cryo-storage elements 320 form merely one unit in this embodiment, as long as the specimens 230 are arranged on the storage substrate 300. As a specimen carrier 321, a specimen accommodation layer is provided for each specimen. The specimen accommodation layer comprises a plastic material, which has a minimal adhesive strength to the base body 310 (for example, made from PTFE or rubber). The minimal adhesive strength is provided, in particular, in low temperature ranges.

[0060] For separating a specimen 330, the specimen is separated with the specimen accommodation layer from the base body with a suitable tool (for example, detached, planed off, pushed off, or pulled off). The specimen data storage 322 remains on the substrate underside.

[0061] The specimens 330 are protected against contamination with a covering 314 in this embodiment. The covering 314 is formed by a cover, which is sealed against the base body 310 via an annular seal 315.

[0062] In FIG. 11, in the upper drawing part in perspective view, a cut-away of a storage substrate 400 according to a further embodiment of the invention is shown. With this storage substrate, the cryo-storage elements 420 are provided in the form of a pre-perforation or a press-fit in the base body 410. The base body 410 and the cryo-storage elements 420 form a flat plate, on whose underside, the storage medium 412 is arranged as a layer. The storage medium 412 (data carrier film) likewise can be pre-perforated and is located on the underside of the base body 410 with the required planarity for optical reading-in and reading-out of data.

[0063] In the lower drawing part of FIG. 11, the cryo-storage element 420 is shown in an enlarged representation.



On the top side of the base body 410, which here forms the specimen carrier 421, a recess is provided as the specimen receptacle 423. In the specimen receptacle, the cryo-specimen (for example, suspension drop) is arranged. With the cover film 414, the specimen 430 is protected against contamination. Also, on the cover film 414, perforations corresponding to the outer shape of the cryo-storage elements 420 can be provided. According to the invention, generally, the cover or cover film can be formed also as a storage medium. With removal of the cryo-storage element 420 from the storage substrate 400 with a tool formed analogously to the illustration in FIG. 2, the specimen 430 is removed with the specimen carrier 420, the specimen data storage 422, and the cut-out of the cover film 414.

[0064] The storage substrate 400 is fixed in a support and is separated from the base body 410 with the punch 451 (or with the blade 452, if necessary) and the cutting device 440. The cutting device 440 is provided with a movable punch 441, which, after separation of the cryo-storage element 420, presses this out of the cutting device.

[0065] FIG. 12 shows a modification to the embodiment of FIG. 11, by way of example, of an individual cryo-storage element 420 with the specimen carrier 421 and the specimen receptacle 423. With this form, the cover 414 is formed as a two-layered film. A porous layer 415 overlies the specimen carrier 421 as a cover. Over that, a sealing layer 416 with an extension 417 extending up from the substrate plane is provided. The extension 417 can be pulled away from the substrate manually or with an appropriate tool. In this manner, the lower layer 415 on the specimen carrier 20 is laid open. This procedure can take place in a deep-freeze state or also in a thawed state. A quick exchange of the liquid in the specimen receptacle 423 can take place. For example, cryo-protective can be washed out of the cell suspension.

[0066] The cover 414 can also contain data or markings for identification of the specimen. According to modified forms, a further structure of the cover 414 formed as additional layers can be provided.

[0067] The principle of the multi-layered cover is also shown in FIG. 13 by way of an example of a further embodiment of the invention. There, the storage substrate 500 includes, in turn, a base body 510 with mushroom-shaped projections 511, on which the specimen carrier 521 sits. The specimen carriers 521 are formed components, respectively, with a specimen receptacle 523 on the upper side and a fixing recess 524 on the underside. The fixing recesses 524 and the projections 511 work together like push buttons as releasable mechanical connections. On the side opposite the specimen carriers 521, a data carrier layer as the storage medium 512 is located, which forms the specimen data storages 522 that are associated with respective specimen carriers 521. The covering 514 takes place according to the double-layer principle, which is illustrated in FIG. 12.

[0068] For removal of a specimen carrier 521 in a frozen state of the storage substrate 500, a planar or wedge-shaped tool is shoved under the specimen carrier 521. With the tool, the connection between the respective projection 511 and the fixing recess 524 is loosened. The specimen is thereby separated from the storage substrate 500 with the specimen carrier 521 and parts of the cover 514. Also with this embodiment, upon separating, the connection to the speci-

men data storage 522 is lost. But, specimen data also can be provided in appropriate parts of the cover 514.

[0069] The embodiment shown in FIGS. 14 through 26 illustrate that the storage substrate 600 is formed by means of at least one circuit board 610, which corresponds to the base body and on which one or more cryo-storage elements 620, like electrical circuits (chips) are arranged. The circuit board 610 supports electrical (conducting paths) or optical (photoconductor fibers) connections 611, which connect, respectively, a receptacle mounting 612 for receiving a cryo-storage element with an external control device (not shown). The receptacle mounting corresponds essentially to a socket of a conventional circuit mounting, in which the contacts of the cryo-storage element (see, for example, FIG. 15) are used. On the receptacle mountings 612, additional circuits for signal modulation, signal conversion, or detection of the data signals running from the connection lines 611 or from the optical path can be provided.

[0070] The connecting lines 611 can be provided on the top side of the circuit board 610 with the receptacle mounting 612 (upper drawing part of FIG. 14) or on the opposite side (lower drawing part of FIG. 14). In the last case, the receptacle mountings 612 are more tightly arranged. The lower drawing part of FIG. 14 shows further than on the circuit board 610, also a computing circuit 613 for control of the cryo-storage elements, with the required RAM storage, if necessary, can be provided.

[0071] Each receptacle mounting 612 is equipped for receiving a cryo-storage element 620. Each cryo-storage element 620 includes a specimen carrier 621, analogous to the above-described function, which is connected with the specimen data storage 622. According to a particular advantageous embodiment of the invention, the cryo-storage element is formed by an integrated circuit (for example, storage components) known as such. The circuit contains as the specimen data storage 622 at least one RAM storage. The cryo-storage element 620 also can contain a complete computing circuit, with which the function of the cryo-storage element is executed and by means of which the cryo-storage element communicates externally. The specimen carrier 621 preferably is formed in or in connection with the plastic covering or encapsulation of the integrated circuit.

[0072] The specimen receptacle 623 is, for example, a recess in the plastic over as shown in FIG. 15. With a conventional chip with a size of 7-14 mm, the specimen receptacle 423 can have a base surface of approximately 4-10 mm with a depth of 1 mm. With these measurements, up to five million cells can be accommodated in the cryo-storage element 620.

[0073] On the bottom of the specimen receptacle 623, additional control devices for manipulation of the specimen sensor and/or display units 624 can be provided. The control devices include, if necessary, cooling and heating elements, for example, peltier elements, resistance heating elements for controlling cooling or heating of the specimen, or materials with increased heat capacity for reduction of the heat load of the specimen during a chip transport. As a display device, a light source can be provided, which, for example, signals a predetermined state of the cryo-storage element 620 or the specimen, or which serves as a measured light source for measurement on the specimen 630. In addition, the cryo-storage element 620 is provided with a

cover 614, which protects the specimen from contamination, evaporation, and sublimation. The cover 614 is a plastic cap, for example, a welded-on film, or another layer-type component, which provides a sealed, releasable connection with the specimen carrier 621.

[0074] The specimen carrier 621 serves also as a guide for the contact connectors 625 of the cryo-storage element. The contact connectors are connected, in particular, with the specimen data storage 622 and, if necessary, to the control and display devices 624.

[0075] In contrast to the diagnosis chips known from cellular biotechnology, with the cryo-storage element 620, no connection exists between the specimen 630 and the specimen data storage 622, the control and/or display devices 624, which is directed to a detection of electrical parameters of the cells frozen in the specimen.

[0076] The cover 614 according to FIG. 15 can also be replaced with a cryo-container 615, according to FIG. 16. With the cryo-container 615, the top side of the specimen carrier 621 is provided with a sealed screw connection to a cylindrical container body 617. The cryo-container 615 comprises a cold-resistant plastic material. The embodiment of the invention shown in FIG. 16 has the advantage that the cryo-container 615 can also be loaded manually, for example, by means of pipettes.

[0077] Detailed further embodiments of the inventive cryo-storage elements 620 are shown in FIGS. 17 through 26. The cryo-storage element 620 according to FIG. 17 includes a specimen carrier 621 and a specimen data storage 622. The specimen data storage 622 is structured like a known electronic storage chip with contact electrodes 625 and an encapsulation 626, in which a storage circuit and, if necessary, a computing circuit are arranged. The encapsulation 626 comprises typically a plastic material.

[0078] The specimen carrier 621 is attached to the top side of the encapsulation 626 or as part of the encapsulation 626. The specimen carrier 621 comprises a plastic frame 627, in which for receiving specimens, at least one cryo-container 615 is integrated. The plastic frame 627 is an injection molded part with a size corresponding to the surface of the encapsulation 626, for example. The lateral frame parts are provided with bores, in which the cryo-containers 625 are arranged.

[0079] Each cryo-container 615 forms at least one elongated specimen chamber. The at least one specimen chamber has an elongated form, such that the inner cross section is essentially smaller than its length. As specimen chambers, for example, hoses, hollow needles, capillaries, or the like are provided. The internal diameter of a specimen chamber lies in the range of 5  $\mu$ m to 4 mm, for example. The length can be chosen to be in the range of 0.5 cm to 10 cm. The quotient of the cross sectional diameter and length of a specimen chamber is preferably smaller than  $\frac{1}{10}$ . The allocation of at least one cryo-container 615 in a tube or hose form has the advantage of a fast loading or emptying of the specimen chambers, a high ability for miniaturization, and a high freezing speed.

[0080] With the embodiment of the invention illustrated in FIG. 17, first a cryo-container 615 is formed by a meander-shaped hose placed in the frame 627 (partially shown). After loading of the cryo-container 615 via the hoses (see arrow),

the parts of the hose designated with dashed lines are cut off, so that the sections drawn through remain as separated cryo-containers (for example, 616). All cryo-containers 615 are loaded as a unit with a common specimen 630, which advantageously is subdivided into specimen parts. With a mechanical separating device 400, the specimen parts 616 can be separated from the cryo-element 620 in a frozen or thawed state, without affecting the remaining specimen parts.

[0081] On the surface of the encapsulation 626 and/or on the frame 627 of the specimen receptacles 623, additional control devices for manipulating of the specimen and/or the sensor and/or the display units 624 can be provided. The control devices include, if necessary, cooling and heating elements, for example, peltier elements, resistance heat elements or the like. They serve for the controlled cooling or heating of the specimen or materials with increased heat capacity for reducing the heat load of the specimen, for example, during a chip transport. The sensor and/or display can have a light source, which signals, for example, a predetermined state of the cryo-storage element 620 or the specimen or serves as a measured light source for measurement on the specimen 630.

[0082] In addition, each end of a cryo-container 615 can be provided with a cover 614, which protects the specimen from contamination, evaporation, and sublimation. The cover 614 is, for example, a plastic cap, a welded-on film or another component, which provides a sealed connection with the ends of the respective cryo-container 615. If a hose is provided as a cryo-container, then the cover can be formed also by means of a part of the hose itself, which is clamped together on its ends.

[0083] Instead of a through-going and, if needed, cut hose, according to FIG. 17, also a plurality of tube-shaped cryo-containers 615 made from a rigid material can be provided as specimen receptacles 623, which are aligned transversely (FIG. 17) or parallel (FIG. 18) to the longitudinal orientation of the cryo-element 620. With the embodiment according to FIG. 18, for example, five cryo-containers 615 are integrated in the encapsulation 626 (enclosed). This can take place by injection of the cryo-container 615 into the encapsulation material or an adhesive bonding. The cryo-containers 615 are formed by hollow needles or capillaries.

[0084] The loading of a cryo-container 615 takes place, in which on one end, a low pressure exists and via the opposite input end 617, the cryo-specimen is received. Instead of applying low pressure, also a specimen receptacle can be provided with the action of capillary forces in the interior of the cryo-containers 615. In particular, with the embodiment according to FIG. 18, the same or different cryo-specimens 631, 632, . . . , can be accommodated in the individual cryo-containers 615. The cryo-containers 615 are preferably spaced from one another, such that the feeding ends 617 are aligned to correspond to the format of a micro- or nanotiter plate.

[0085] According to an alternative embodiment of the inventive cryo-element 620 illustrated in FIG. 19, the cryo-container 615 of the specimen carrier 622 is formed as a hose, whose diameter in the longitudinal direction of the hose is changeable. Sections 618 change with a small diameter and chamber parts 619, in which the hose is considerably widened. The cryo-container 615 includes a

plurality of chamber parts 619, which advantageously, can be separated from the cryo-element with a mechanical separating device 400. The cryo-container is attached on the encapsulation 626 of the specimen storage 622 (for example, adhered or partially injected). The loading of the cryo-container 615 takes place under formation of a low pressure, which is absorbed via the input end 617 in the suspended cryo-specimen in the cryo-container 615.

[0086] According to FIG. 20, the cryo-container 615 also can be formed from a hose, which has only one chamber part 619, which, as shown, is loaded or emptied via a hose section 618 or alternatively, via multiple hose sections. The chamber part 619 according to FIG. 20 is formed from a film material, which is adhered on the encapsulation 626.

[0087] In contrast to the diagnosis chips known from cellular biotechnology, with cryo-storage elements 620, no connection exists between the specimen 630 on the one hand, and the specimen data storage 622 and/or the control, sensor, and/or display devices 624, on the other hand, which is directed toward a determination of electrical parameters of the cells frozen in the specimen.

[0088] In FIGS. 21 and 22, further details of the loading and the specimen removal from cryo-elements 620 are illustrated. The loading takes place according to FIG. 21, for example, with a loading device, which on one side, has a plurality of specimen reservoirs 710, and on the other side, has a pressure device 720. The cryo-storage element 620 includes a frame-type specimen carrier 621, analogous to the embodiment shown in FIG. 17, on which a plurality of cryo-containers 615 in the form of capillaries or hoses are arranged, whose feeding ends 617 project into the specimen reservoir 710. The specimen reservoirs 710 are reservoirs, in which specimens are located after extraction of a specimen. The pressure device 720 includes a pressure attachment 721, which can be placed in pressure-tight manner on the opposite ends of the cryo-container 615, and a connection line 722, via which all cryo-containers 615 can be pressurized with low pressure. The ends of the cryo-container 615 are preferably mounted for common receipt of the pressure attachment 721 on a frame part. They can, for example, open into the surface of the frame 627. Under the action of the low pressure, specimens 630 are accommodated into the cryo-container 615.

[0089] After the loading of the specimen carriers 621, the cryo-storage element 620 is separated from the loading device. The input ends 617 are shortened, if necessary, to the frame 627. The cryo-storage element 620 is placed on a storage substrate 610 (see FIG. 14), and with this, is transferred in an environment with a reduced temperature, for example, a cryo-container in a cryo-bank.

[0090] In FIG. 22, one possibility of specimen removal from a cryo-storage element 620 with a meandering-designed cryo-container 615 is illustrated. The specimen parts 616 are separated with a mechanical separating device 400, for example, a cutting device. This can take place advantageously in a state of reduced temperature, so that the remaining specimens can remain unchanged.

[0091] In FIGS. 23 through 26, embodiments of the inventively used cryo-storage elements 620 are shown, which, in contrast to the above-described embodiments of the specimen holder 621, is integrated not in an encapsula-

tion of the storage circuit, rather in its substrate material. FIG. 23 shows, for example, a part of a cryo-storage element 620 (without encapsulation and without contact connector). A storage circuit 800 with a substrate 810 and integrated components 820 are shown in sections. The substrate is a semi-conductor wafer, for example, as are commonly used for manufacturing of integrated circuits. On the upper side of the substrate 810, the components 820 are processed with a known method of semi-conductor technology. On the underside of the substrate 810, channel-like specimen chambers 623 are formed as specimen receptacles, which are closed with a cover layer 820. The specimen chambers 623 have measurements of 400  $\mu\text{m}$ , for example (cross sectional dimension) and 20 mm (length). The specimen chambers 623 can also be formed in a structured substrate layer, which is arranged on the substrate (see FIG. 24). The cover layer 830 comprises a plastic material, glass, or a semiconductor material.

[0092] In addition, multiple levels with specimen chambers 623 can be provided, as illustrated in FIG. 24. On the substrate 810, a first structured substrate layer 811 with specimen chambers 623 and a first cover layer 830 can be provided. On the first cover layer 830, at least one further structured substrate layer 812 with specimen chambers 623 and a further cover layer 831 can be provided. With this embodiment, advantageously, an enlarged specimen volume on the associated specimen data storage is absorbed. The filling or specimen absorption on the cryo-storage elements 620, according to FIGS. 23 and 24, takes place via hose connections, which are integrated in the encapsulation of the specimen data carrier 622 and are cut off or pinched off after use.

[0093] In FIGS. 25 and 26, various geometries of the channel-shaped specimen receptacles 623 in the substrates 810 are schematically illustrated. For example, meandering or U-shaped channel shapes with various cross sectional dimensions can be provided, which, if necessary, are arranged nested in one another.

[0094] The embodiments of the invention shown in FIGS. 14 through 26 have a series of advantages. The cryo-storage element is formed by an electronic chip, which contains an electronic storage that is externally writable and readable as the specimen data storage. A temperature-dependent adjustment of a reading/writing head, like that in a CD storage, is not necessary. In the chip, at least one specimen receptacle corresponding to one or more specimens is located. The chip and/or the receptacle mounting can be equipped with an electronic switch for controlling additional functional elements, sensors, and/or alarm systems. The structure shown in FIG. 14 can be made as a three-dimensional multi-level cryo-substrate, in which multiple circuit boards 610 are stacked with a plurality of cryo-storage elements over one another.

[0095] The chip-type storage elements can be removed in a frozen state from the circuit board without problems and transferred to other circuit boards, measuring devices, or processing stations, without losing the specimen data. The cryo-storage elements are electronically addressable externally.

[0096] In addition, for multiple safeguarding, the cryo-storage elements can be provided with one or more identifiers, automatically readable or visually controllable colored

markings. The cryo-storage elements, according to FIG. 15, also allow further miniaturization, compared to the dimensions of common integrated circuits. With miniaturization, an optimal control is preferred, instead of the electrical contact.

[0097] The at least one circuit board of a storage substrate can be connected with a computer bus system, with which an individual inquiry and control of the individual cryo-storage elements takes place. The form of the cryo-storage elements shown in FIG. 15 can be modified depending on the application (for example, round or polygonal specimen carriers).

[0098] Important features of the invention are condensed in the following description.

[0099] The inventive storage substrate combines a material receptacle with a specimen-specific data receptacle. During low-temperature storage, the selective removal of materials (cells, cell suspensions) and the reading/storage of data and/or data material are possible.

[0100] The data identification is multiply ensured, in that the specimens and the specimen data storage are arranged on the same or directly adjacent substrate positions. In addition, the storage substrate can be dyed, so that based on the color of the cryo-storage element along and the base body, it can be determined from which storage substrate the respective specimen originates.

[0101] The cryo-storage elements can be easily disinfected and reused. Further, they form a protection for the specimens against environmental conditions with the inventive cryo-preservation.

[0102] It is also possible to provide the base body and the cryo-storage elements of a storage substrate as one unit with a colored or a digital or analogue identification sample, which allows a clear arrangement of both parts at any time. This has advantages for an automated, optical control (for example, dye and coding detection).

[0103] For the first time, specimen data can be stored in ranges of kilobytes to megabytes on the inventive cryo-storage. This is particularly advantageous with the storage of measurement results.

[0104] During the expected useful life of a storage substrate, data can be supplemented at any time (data accumulation). In this manner, all data acquired on the specimen or all performed manipulations, measurements, treatments, or the like can be documented specimen-specific completely and without interruption.

[0105] Specific treatments of the specimens, in particular, in the chip-type storage elements, can be performed selectively with a procedure programming and storage. For example, in the frame of a cryo-preservation, a predetermined heating, cooling, measuring, controlling, and alarm/display program can operated and be documented in a program data storage. In a frozen state, various temperature or measuring programs can run for different cryo-storage elements. For example, local thawing can be triggered, in order to perform a measurement of the specimen. The above-described heating elements can be used with all embodiments of the inventive storage substrate for a local heating of storage media. On the storage media, localized heating can occur, while the associated specimen remains in a cryo-preserved state.

[0106] According to the present invention, it can be provided that the storage substrate is operated combined with a mere electronic data bank, in which the specimen data of the storage substrate are stored in a mirrored fashion.

[0107] The covering of the specimen receptacles can be partially or completely transparent. Through this layer, optical and other measuring methods are coupled in the specimen receptacles. For example, the specimens can be shown pictorially. Fluorescent measurements, dielectric measurements, and/or ultrasonic representations are possible.

[0108] An inventive cryo-data bank includes a plurality of the above-described storage substrates, a control device, and a processing device for manipulating the storage substrates and for removal of specimens.

[0109] The features of the invention disclosed in the foregoing description, the claims, and the drawings can be of importance both individually as well as in desired combinations for the implementation of the invention in its various embodiments.

1. A method for cryo-preservation, in which a plurality of specimens is arranged on a storage substrate and specimen data, which are characteristic for features of a respective one of the specimens, are stored at specific positions.

2. The method according to claim 1, in which the specimen data specimen data are stored on, near, or under the associated specimen.

3. The method according to claim 1 or 2, in which as the specimen data, information for identification of the specimens, information about substance features of the specimens, measurement results, and/or treatment steps are stored.

4. The method according to one of the preceding claims, in which the specimen data are read and/or written in a cooled state of the storage substrate.

5. The method according to one of the preceding claims, in which a respective specimen is arranged on a specimen carrier and the associated specimen data are stored in a specimen data storage medium, whereby, respectively, a specimen carrier and a specimen data storage medium form a composite component that is releasable from the storage substrate for specimen removal.

6. The method according to claim 5, in which a specimen is removed from the substrate storage medium in connection with the stored specimen data and is transferred onto another substrate or to a measuring device or a treatment device.

7. The method according to one of the preceding claims, in which the specimen data are stored optically, magnetically, topographically, or electromagnetically.

8. The method according to one of the preceding claims, in which the specimens include suspensions of at least one cell, cell component, cell aggregate, and/or tissue.

9. The method according to claim 8, in which the specimens include supplementary reference and probe specimens.

10. The method according to one of the preceding claims, in which, on a frozen, heated or thawed specimen in a cooled state of the remaining storage substrate, a measurement and/or a treatment takes place and measurement results are stored as specimen data.

11. The method according to one of the preceding claims, in which a control of the state of at least one specimen on the storage substrate takes place with a computing circuit associated with the specimen.

12. A storage substrate for cryo-preservation of a plurality of specimens, which contains a plurality of cryo-storage elements, which are formed, respectively, by means of a composite component from a specimen carrier and a specimen data storage medium.

13. The storage substrate according to claim 12, in which each cryo-storage element is arranged releasably in a base body of the storage substrate.

14. The storage substrate according to one of claims 12 or 13, in which a moulded component is provided as the cryo-storage element, which includes the specimen carrier and the specimen data storage medium.

15. The storage substrate according to one of claims 12 or 13, in which an integrated circuit with a storage medium is provided as the cryo-storage element, which is equipped with at least one specimen carrier for respectively receiving a specimen.

16. The storage substrate according to claim 15, in which the specimen carrier is integrated in the structure of the integrated circuit.

17. The storage substrate according to claim 16, in which the specimen carrier has a cryo-container.

18. The storage substrate according to claim 16, in which the specimen carrier has at least one hose-shaped, capillary-shaped, or channel-shaped specimen chamber.

19. The storage substrate according to claim 16, in which the specimen carrier is provided as a channel-shaped specimen receptacle in a substrate of the integrated circuit.

20. The storage substrate according to claim 16, in which the cryo-storage element contains a computing circuit, with which the function of the cryo-storage element is managed and by means of which, the cryo-storage element communicates externally.

21. A cryo-storage element, which includes a specimen carrier for a specimen and a data storage medium for storage of specimen data.

22. A method for operating a cryo-bank, in which the specimens are cryo-preserved and/or treated with a method according to one of claims 1 through 11.

\* \* \* \* \*